

Université de Sherbrooke

CDK8 : une cible de la voie KRAS/MAP Kinase dans la carcinogénèse colorectale.

Par

Morgane Placet

Programme de Biologie Cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention
du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en Biologie Cellulaire.

Sherbrooke, Québec, Canada

Janvier 2014

Membres du jury d'évaluation

P^{re} Nathalie Rivard, programme de Biologie Cellulaire.

Pr Claude Asselin, programme de Biologie Cellulaire

Pr François-Michel Boisvert, programme de Biologie Cellulaire

P^{re} Christine Lavoie, programme de Pharmacologie

Morgane Placet 15 Janvier 2014.

RÉSUMÉ

CDK8 : une cible de la voie KRAS/MAP Kinase dans la carcinogénèse colorectale.

Par

Morgane Placet

Programme de Biologie Cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.), en Biologie Cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1H5N4

La voie KRAS/BRAF/MEK/ERK MAP Kinase joue un rôle clé dans le contrôle de la prolifération des cellules épithéliales intestinales normales et cancéreuses. En effet, on retrouve des mutations du gène *KRAS* dans près de 35 à 40% des cancers colorectaux et une mutation du gène *BRAF* dans 10 à 15% des cas. Ces mutations de type gain-de-fonction sont mutuellement exclusives, ce qui suggère que la signalisation MEK/ERK qui est en aval de BRAF joue possiblement un rôle crucial dans le développement de plus de 60% des cancers colorectaux. Notre laboratoire a d'ailleurs rapporté que l'expression d'une forme mutante hyperactive de MEK1 est suffisante pour induire la transformation des cellules épithéliales intestinales normales en culture. Cette transformation est caractérisée par une transition épithélium-mésenchyme (EMT) conférant aux cellules des capacités tumorales, invasives et métastatiques. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets transformant de MEK1, une analyse comparative par micropuces d'ADN (Affymetrix) a été effectuée et celle-ci a montré que le gène codant pour la protéine CDK8, une kinase dépendante des cyclines, est un des gènes les plus induits (12 fois) par l'hyperactivation de MEK1. Ce résultat suggérerait l'implication de CDK8 dans l'oncogénèse colorectale induite par l'hyperactivation de la voie KRAS/MAP Kinase. De manière intéressante, nous avons d'abord mis en évidence que CDK8 était surexprimée dans des tumeurs de patients atteints de cancer colorectal de différents stades ainsi que dans des lignées cancéreuses colorectales humaines. Parmi ces lignées cellulaires analysées, nous avons mis en évidence que cette surexpression était en partie dépendante de l'activité MEK. Nous avons aussi confirmé la surexpression de CDK8 dans des lignées de cellules épithéliales intestinales de rat exprimant les oncogènes KRAS ou BRAF ou le mutant de MEK1 constitutivement actif. La baisse d'expression de CDK8 par l'utilisation d'un shARN a révélé que CDK8 contribue à l'hyperprolifération cellulaire ainsi qu'à la croissance en indépendance d'ancrage induite par l'expression du mutant hyperactif de MEK1. De plus, la baisse d'expression de CDK8 atténue le phénotype fibroblastique des cellules transformées par l'oncogène BRAF ou le mutant de MEK1 constitutivement actif, qui exhibent un phénotype plus épithélial. Nous avons pu mettre en évidence que CDK8 serait impliqué dans l'expression de gènes liés à la morphologie cellulaire tel que *Snail1*, *Snail2* et *Gem*. Nos résultats montrent donc que CDK8 contribue au potentiel oncogénique de la voie MAP Kinase dans les cellules épithéliales intestinales en modulant leurs capacités prolifératives et leur transformation morphologique.

Mots clés : CDK8, voie KRAS/MAP Kinase, transformation cellulaire, cancer colorectal.

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ	II
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	X
 INTRODUCTION	 1
 1. Le cancer colorectal	 1
<i>1.1 Quelques chiffres</i>	1
<i>1.2 Établissement de la carcinogénèse colorectale</i>	1
 2. La voie KRAS/ MAP Kinase dans la carcinogénèse colorectale	 3
<i>2.1 La protéine KRAS</i>	3
<i>2.2 La voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK</i>	6
<i>2.3 L'implication de MEK/ERK dans la carcinogénèse colorectale</i>	8
 3. La protéine kinase CDK8 et son rôle potentiel dans la carcinogénèse colorectale	 13
<i>3.1 Historique</i>	13
<i>3.2 CDK8 régulateur négatif de la transcription</i>	16
<i>3.3 CDK8 régulateur positif de la transcription</i>	17
<i>3.4 CDK8 et cancer colorectal</i>	19
 4. Hypothèse et Objectifs	 20

MATÉRIELS ET MÉTHODES	22
1. Culture cellulaire	22
2. Infection lentivirale	22
3. Immunobuvardage	23
4. Extraction d'ARN	26
5. RT-PCR et qPCR	27
6. Immunofluorescence	29
7. Analyse de la prolifération	29
8. Analyse de la capacité de croissance en indépendance d'ancrage	30
RÉSULTATS	31
1. Expression de CDK8 dans des tumeurs colorectales, dans des lignées cancéreuses colorectales humaines en culture et dans des cellules IEC-6 transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase	31
<i>1.1 Expression de CDK8 dans des tumeurs de patients atteints de cancer colorectal</i>	31
<i>1.2 Expression de CDK8 dans des lignées cancéreuses colorectales humaines</i>	32
<i>1.3 Expression de CDK8 dans les cellules épithéliales transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase</i>	32
<i>1.4 L'induction de l'expression de CDK8 précède la transformation morphologique des cellules exprimant le BRAF oncogénique inducible</i>	33

2. Analyse de la contribution de CDK8 dans la transformation des cellules épithéliales intestinales induite par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase	37
<i>2.1 Impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur la prolifération des cellules transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase</i>	40
<i>2.1.1 Incorporation de BrdU dans les cellules IEC-6 BRAF^{V600E}ER inducible</i>	40
<i>2.1.2 Décompte cellulaire et établissement d'une courbe de prolifération</i>	42
<i>2.2 Impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur le potentiel des cellules transformées à croître en indépendance d'ancrage</i>	42
<i>2.3 Impact de l'inhibition de CDK8 sur la morphologie des cellules transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase</i>	45
 3. Rôle de CDK8 dans la transformation morphologique induite par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase	 46
<i>3.1 Implication de CDK8 dans l'expression des gènes associés à l'EMT</i>	46
<i>3.2 Implication de CDK8 dans l'expression de Gem</i>	50
 DISCUSSION	 52
 1. Expression de CDK8 et néoplasie colorectale	 53
<i>1.1 Surexpression de CDK8 dans les cellules et tumeurs cancéreuses colorectales humaines</i>	53
<i>1.2 Surexpression de CDK8 dans les cellules épithéliales intestinales transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase</i>	56
<i>1.3 Induction de l'expression de CDK8 précède la transformation oncogénique</i>	58
 2. Contribution de CDK8 à la transformation des cellules épithéliales intestinales induite par l'activation oncogénique de la voie KRAS/MAP Kinase	 58
<i>2.1 Impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur la prolifération des cellules IEC-6 BRAF^{V600E}ER et IEC-6 MEKca</i>	59
<i>2.2 Impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur la transformation morphologique des cellules transformées par les formes oncogéniques de BRAF ou de MEK1</i>	61
<i>2.2.1 Rôle de CDK8 dans la morphologie cellulaire</i>	61

2.2.2 <i>CDK8 est impliquée dans la régulation des gènes associés à l'EMT</i>	63
2.2.3 <i>CDK8 régule l'expression de Gem</i>	64
3. CDK8 : une cible thérapeutique dans le cancer colorectal?	66
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	69
REMERCIEMENTS	72
LISTE DES RÉFÉRENCES	73
ANNEXE	79

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Modèle classique d'établissement de l'oncogenèse colorectale	4
Figure 2 : Voie de signalisation canonique Wnt/β-caténine	5
Figure 3 : Modèle d'activation de la protéine RAS	7
Figure 4 : Principales voies de signalisation activées par la protéine RAS	9
Figure 5 : Voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK	10
Figure 6 : Liste des gènes associés à la prolifération, à l'adhésion et à la migration modulés par l'activation constitutive de la kinase MEK1	14
Figure 7 : Complexe de pré-initiation et ses composantes	15
Figure 8 : Régulation positive de la transcription par CDK8	18
Figure 9 : Induction de l'expression de BRAF^{V600E}ER oncogénique	25
Figure 10 : L'expression de CDK8 est augmentée dans des tumeurs colorectales	34
Figure 11 : L'expression de CDK8 est augmentée dans les lignées cancéreuses colorectales humaines	35
Figure 12 : L'expression de CDK8 est augmentée dans les lignées IEC-6 transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase	36
Figure 13 : Expression de CDK8 dans les cellules IEC-6 BRAF^{V600E}ER suivant une stimulation au tamoxifène, au cours du temps	38

Figure 14 : Validation de l'inhibition de l'expression de CDK8 <i>via</i> un shARN dans les lignées cellulaires IEC-6 exprimant le BRAF^{V600E}ER oncogénique et les formes sauvage ou active de MEK1	39
Figure 15 : L'inhibition d'expression de CDK8 sur l'entrée en phase S des cellules transformées par le BRAF^{V600E}ER inducible	41
Figure 16 : Impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur la prolifération des cellules transformées par l'hyperactivation de MEK1	43
Figure 17 : Impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur la croissance en indépendance d'ancrage des cellules IEC-6 transformées par une forme hyperactive de MEK1	44
Figure 18 : Impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur la morphologie des cellules transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase	47
Figure 19 : Rôle de CDK8 dans la transformation morphologique des cellules exprimant le mutant constitutif actif de MEK1	48
Figure 20 : Impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur les protéines ou gènes liés à l'EMT	49
Figure 21 : Analyse de l'expression de <i>gem</i> suite à l'induction du BRAF oncogénique	51
Figure 22 : Régulation de CDK8 par la voie KRAS/MAP Kinase durant la transformation des cellules de l'épithélium intestinal	68

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des lignées cellulaires intestinales humaines utilisées	24
Tableau 2 : Séquence des oligonucléotides du shARN dirigé contre CDK8 et du shARN contrôle	28
Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés	28

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Act :	Activateur
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
APC :	Adenomatous polyposis coli
ARF :	Alternative Reading Frame
ARN :	Acide RiboNucléique
BSA :	Bovin Serum Albumine
BrdU :	BromodéoxyUridine
°C :	degré Celsius
CDK :	Cyclin-Dependent Kinase
CIMP :	The CpG island methylator phenotype
CIN :	Chromosomal Instability pathway
CK1 α :	Casein Kinase 1 α
CRD :	Cystein-Rich Domain
CTD :	C-Terminal Domain
Ctrl :	contrôle
DAPI :	4',6'-diamidino-2-phénylindole
dNTP :	désoxyriboNucléotides TriPhosphate
EMT :	Epithelium-Mesenchyme Transition
ERK :	Extracellular signal-regulated kinase
FITC :	Fluorescein isothiocyanate
g :	gramme
GAP :	GTPase-Activating Protein
GEF :	Guanine nucleotide Exchange Factors
GDP :	Guanosine DiPhosphate
GRB2 :	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3 β :	Glycogen Synthase Kinase-3 Beta
GTP :	Guanosine TriPhosphate
h :	heure

HIEC :	Human Intestinal Epithelial Cell
HIF :	Hypoxia Inducible Factor
IEC :	Intestinal Epithelial Cell
IEG :	Immediate Early Gene
JNK :	c-Jun N-terminal kinases
kDa :	kilo Dalton
L :	Litre
M :	molaire
MAP Kinase :	Mitogen-activated protein kinase
MDa :	Méga Dalton
MEK :	Mitogen-activated protein kinase kinase
µg :	microgramme
min :	minute
mL :	millilitre
mm :	millimètre
mM :	millimolaire
MMP :	Matrix MetalloProtease
MSI :	MicroSatellite Instability
mTOR :	mammalian Target of Rapamycin
N :	Normal
nM :	nanoMolaire
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PI3K :	Phosphatidylinositide 3-kinase
PIC :	Pre-initiation Complex
PKC :	Protein Kinase C
PVDF :	Polyfluorure de Vinylidène
qPCR :	quantitative Polymerase Chain Reaction
RAF :	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
RAN :	RAS-related Nuclear protein
RAS :	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

RBD :	Ras Binding Domain
RE :	Regulation Element
RGK :	Rad Gem Kir proteins
Rho :	Rhodopsin
ROCK :	Rho-associated protein kinase
RT :	Reverse Transcription
RTK :	Récepteur Tyrosine Kinase
S :	Sain
Shc :	SHC-transforming protein
Snail :	Snail family zinc finger
SOS :	Son of Sevenless
T :	Tumeur
TGFβRII :	Transforming Growth Factor Beta Receptor Type II
Wt :	Wild Type

INTRODUCTION

1. Le cancer colorectal

1.1 Quelques chiffres

Selon la Société Canadienne du Cancer, le cancer colorectal est le 3^{ème} type de cancer le plus couramment diagnostiqué au Canada. C'est la 2^{ème} cause de décès par cancer chez l'homme et la 3^{ème} chez la femme. Elle estime qu'en 2013, 23 900 canadiens recevront un diagnostic de cancer colorectal, ce qui représente 13% de tous les nouveaux cas de cancer et qu'environ 9 200 en mourront, ce qui représente 12% des décès par cancer. Cependant, grâce aux progrès de la recherche, le taux de mortalité dû au cancer colorectal est à la baisse chez l'homme depuis 2004 et chez la femme depuis 2000.

1.2 Établissement de la carcinogénèse colorectale

Comme son nom l'indique, le cancer colorectal touche l'épithélium du colon et du rectum qui forment le gros intestin, c'est-à-dire la partie terminale du tube digestif. Le cancer colorectal prend généralement plusieurs années à se former *via* une succession d'altérations génétiques qui vont entraîner des modifications morphologiques de l'épithélium intestinal.

Le cancer colorectal est un cancer très hétérogène d'un point de vue moléculaire. Il y a trois voies majeures conduisant à l'établissement de la carcinogénèse colorectale : l'instabilité chromosomique (CIN), la méthylation des îlots CpG (CIMP) et l'instabilité des microsatellites (MSI). L'instabilité chromosomique (CIN) concerne 70% à 85% des cas de cancers colorectaux. Il s'agit d'une succession d'anomalies de structure ou de copie au

niveau des chromosomes. Ces anomalies vont entraîner des mutations dans des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs, induisant une modification de l'épithélium intestinal normal en adénomes, adénocarcinomes, adénocarcinomes invasifs puis métastases, suivant le modèle décrit par Fearon et Vogelstein en 1990 (Figure 1) [Moran *et al.*, 2010]. La méthylation des îlots CpG (CIMP) concerne environ 15% des cancers sporadiques. Elle implique une instabilité épigénétique en méthylant des régions promotrices de gènes suppresseurs de tumeurs ou d'oncogènes impliqués dans la carcinogénèse colorectale. Enfin, l'instabilité des microsatellites est impliquée dans 15% à 20% des cancers sporadiques. Les microsatellites sont des séquences répétées de nucléotides dispersées à travers le génome. On retrouve de l'instabilité dans les microsatellites d'oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la carcinogénèse colorectale [Worthley et Leggett, 2010].

L'un des premiers gènes mutés lors de l'établissement de la carcinogénèse colorectale est le gène suppresseur de tumeur *APC*, localisé sur le bras long du chromosome 5. Ce gène encode pour la protéine APC, impliquée dans la voie de signalisation intracellulaire Wnt/ β -caténine qui régule la prolifération des cellules souches et progénitrices de la crypte intestinale [Pinto *et al.*, 2003; Kunhert *et al.*, 2004]. En effet, la protéine APC forme avec l'axine, la protéine GSK3 β , et la caséine kinase 1 α , un complexe multiprotéique. En absence des facteurs de croissance de la famille Wnt, ce complexe interagit avec la β -caténine entraînant sa phosphorylation séquentielle sur plusieurs sérines, ce qui permet son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Au contraire, en présence d'une stimulation par un facteur Wnt, ce complexe multiprotéique est déstabilisé, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme de la cellule, transloque au noyau où elle va s'hétérodimériser avec un membre de la famille TCF/LEF, TCF4 dans l'épithélium intestinal [Pinto *et al.*, 2003; Kunhert *et al.*, 2004], et ainsi former un complexe transcriptionnellement actif. Ce complexe transcriptionnel va transactiver la transcription de plusieurs gènes dont plusieurs sont impliqués dans la progression du cycle cellulaire (*cycline D1*, *c-myc*) ou dans la progression tumorale (*MMP-7*, *MMP-26*) (Figure 2). On retrouve le gène *APC* muté dans près de 60% des cancers coliques et 82% des

cancers rectaux [Moran *et al.*, 2010]. Cette mutation entraîne la production d'une protéine tronquée qui ne peut plus interagir avec l'axine et la GSK3 β pour former le complexe de dégradation de la β -caténine, aboutissant ainsi à une stabilisation de la β -caténine et une activation constitutive du complexe transcriptionnel- β -caténine/TCF4 [Moran *et al.*, 2010]. Un autre oncogène fréquemment muté dans la carcinogénèse colorectale est l'oncogène *KRAS*. Il est muté dans 35% à 40% des cas de cancers colorectaux et plus particulièrement à des stades précoces de la carcinogénèse. Le gène *KRAS* encode une petite protéine GTPasique de 21kDa, qui lorsqu'elle est mutée, entraîne une activation constitutive des voies de signalisation en aval. Cette mutation est généralement associée à l'évolution d'un adénome en adénocarcinome [Worthley et Leggett, 2010]. On retrouve également des mutations dans le gène suppresseur de tumeur *TP53*, localisé sur le bras court du chromosome 17, mais celles-ci sont observées plus tardivement dans l'établissement de la carcinogénèse colorectale. Outre les gènes *KRAS*, *APC* et *TP53* mutés dans une grande proportion des cancers colorectaux, plusieurs autres gènes sont fréquemment impliqués dans la progression tumorale (*DCC*, *TGF β RII*, *SMAD4*, *β -caténine*, *BRAF*, *Ink4a/Arf*, etc.) [Fearon, 2011].

2. La voie KRAS/MAP Kinase dans la carcinogénèse colorectale.

2.1 La protéine KRAS

L'oncogène *KRAS* est donc important dans l'établissement de la carcinogénèse colorectale puisqu'on le retrouve muté dans 35% à 40% des cas. Ce gène encode une petite protéine de 21kDa appartenant à la grande famille des protéines GTPases qui compte environ 154 membres. Cette famille est divisée en 4 sous-familles de protéines classées selon leur séquence ADN et leur fonction. On retrouve les sous-familles RAS, RHO, ARF et RAN.

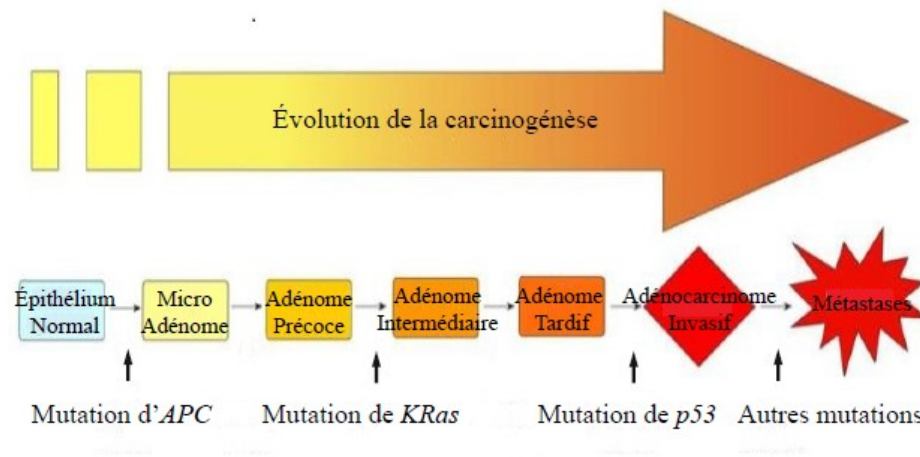


Figure 1: Modèle classique d'établissement de l'oncogénèse colorectale.

Une succession de mutations dans différents gènes suppresseurs de tumeurs comme APC ou des oncogènes comme KRAS aboutit à des modifications morphologiques de l'épithélium normal qui va former un adénome, puis un adénocarcinome et des métastases. [Tiré et adapté de Moran et al., 2010].

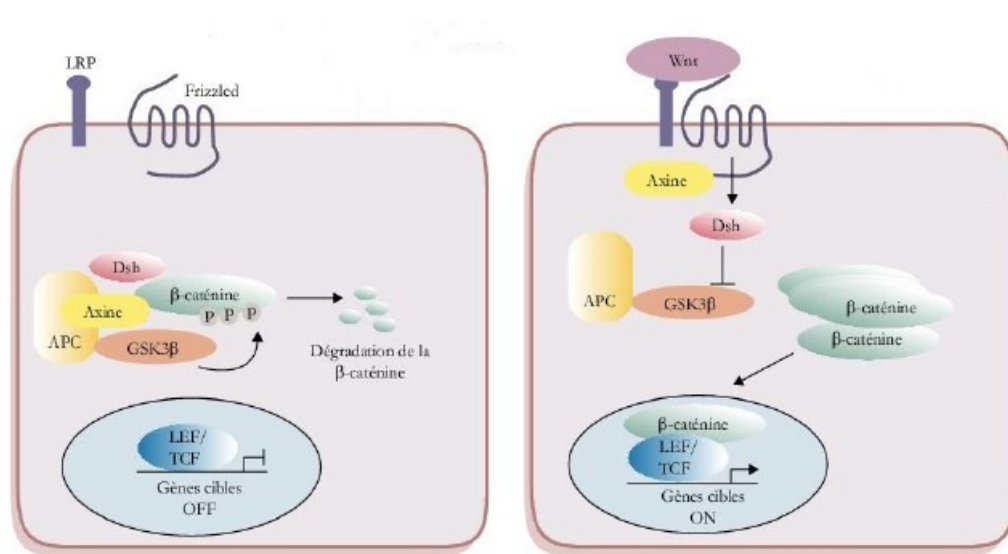


Figure 2: Voie de signalisation canonique Wnt/β-caténine.

La voie de signalisation canonique Wnt/β-caténine est impliquée dans la croissance cellulaire, l'apoptose et la différenciation cellulaire. La régulation de la voie Wnt/β-caténine se fait via un complexe multiprotéique composé de APC, axine, CK1 et GSK3β qui va phosphoryler la β-caténine et induire sa dégradation par le protéasome. Lors de l'activation de la voie, ce complexe est dissocié, entraînant l'accumulation de la β-caténine dans le cytoplasme, sa translocation au noyau et son association à son partenaire transcriptionnel TCF4 pour induire la transcription de nombreux gènes cibles. [Tiré et adapté de L'Allemain, 2006].

KRAS comme son nom l'indique appartient à la sous-famille RAS qui compte 4 membres : HRAS, NRAS, KRAS4A et KRAS4B. KRAS4A et KRAS4B sont des variants d'épissage obtenus par épissage alternatif dans la partie C-terminale du gène *KRAS*. La forme KRAS4B est la plus commune. [Brand et Wheeler, 2012]. Les protéines RAS sont rattachées à la membrane plasmique du côté cytosolique par leur côté C-terminal *via* une farnésylation et une géranylgéranylation. Dans les cellules quiescentes, la protéine RAS est liée à du GDP et se trouve donc sous forme inactive. L'activation de la protéine RAS se fait principalement lors de la liaison de divers facteurs de croissance sur des récepteurs tyrosine kinase, entraînant leur dimérisation et l'autophosphorylation de résidus tyrosines spécifiques dans la région C-terminale. Ceci génère des sites de liaison pour les protéines adaptatrices, telles que GRB2 qui va recruter une protéine GEF (Guanosine Exchange Factors) comme SOS. Cette GEF va activer la protéine RAS en stimulant l'échange du GDP par du GTP, entraînant un changement conformationnel de la protéine qui va faciliter le recrutement des protéines effectrices et induire leur activation. L'activation de la protéine RAS est un phénomène cyclique. En effet celle-ci possède une activité GTPasique intrinsèque qui va induire l'hydrolyse du GTP en GDP, mais ce processus n'est pas suffisant et il requiert la présence d'une protéine GAP (GTPase Activating Protein) pour stabiliser et accélérer l'activité catalytique de RAS [Santarpia *et al.*, 2012] (Figure 3).

La mutation de KRAS la plus commune dans le cancer colorectal est une substitution au niveau du codon 12 de l'exon 2 d'une glycine en acide aspartique. Cette mutation active le potentiel oncogénique de KRAS en déstabilisant son activité GTPasique intrinsèque entraînant ainsi une activation constitutive [Brand et Wheeler, 2012].

2.2 La voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK

La protéine RAS régule de nombreuses voies de signalisation intracellulaire notamment la voie Raf/MEK/ERK surtout importante dans la prolifération cellulaire [Chambard *et al.*, 2007], la voie PI3K/Akt/mTOR impliquée surtout dans la survie et la synthèse protéique [Yarden et Sliwkowski, 2001]

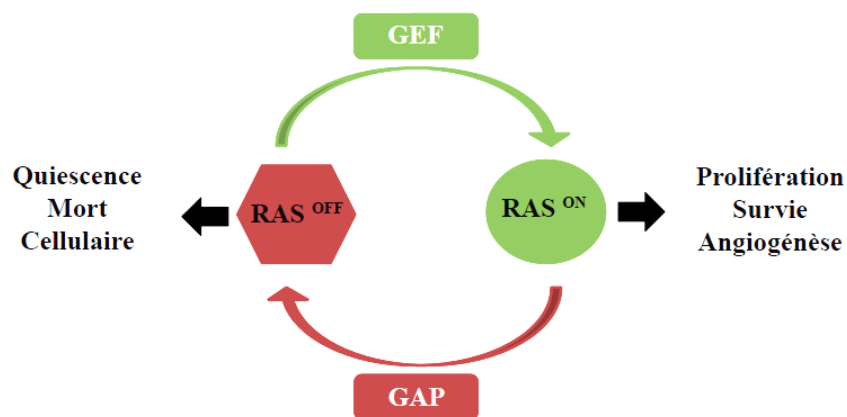


Figure 3: Modèle d'activation de la protéine RAS.

La protéine RAS est liée au GDP lorsqu'elle est inactive. Lors de son activation dans des situations de prolifération ou de survie, une protéine GEF (Guanosine Exchange Factor) permet la liaison d'une molécule de GTP. Lors de l'inactivation de la protéine RAS, son activité GTPase intrinsèque associée à l'activité GTPase d'une protéine GAP permet l'hydrolyse du GTP en GDP et le retour à une configuration inactive de la protéine RAS. [Tiré et adapté de Calvisi et al., 2001].

et la voie Rac/Ral impliquée dans la régulation du cytosquelette et le trafic vésiculaire [Matsubara *et al.*, 1999] (Figure 4). De manière intéressante, le gène encodant pour BRAF est muté dans 10% à 15% des cas de cancers colorectaux. La mutation retrouvée de manière mutuellement exclusive avec celle de KRAS, est un gain de fonction *via* la substitution de la valine 600 en acide glutamique [Di Fiore *et al.*, 2010]. BRAF est une sérine-thréonine kinase appartenant à la famille des protéines RAF qui compte trois membres : ARAF, BRAF et CRAF. Celles-ci sont sujettes à une régulation particulièrement complexe par de nombreux sites de phosphorylation [Wellbrock *et al.*, 2004]. La protéine BRAF est activée *via* la protéine KRAS-GTP qui se lie sur deux domaines : le domaine RBD (Ras Binding Domain) et le domaine CRD (Cystein rich Domain). Une fois activée, BRAF va activer les kinases à double spécificité MEK1 et MEK2 par phosphorylation de deux résidus sérines en position 217 et 221. Une fois activées, les protéines kinases MEK vont activer les sérine-thréonine kinases ERK1 et ERK2 de 44kDa et 42kDa par phosphorylation d'un résidu thréonine et d'un résidu tyrosine dans une séquence TEY au niveau du domaine d'activation [Brand et Wheeler, 2012; Chambard *et al.*, 2007]. Une fois activées, les protéines kinases ERK1 et ERK2 peuvent alors phosphoryler des substrats cytoplasmiques, tel que la protéine SOS, ce qui va entraîner une déstabilisation du complexe SOS-GRB2. Elles ont également des substrats membranaires comme le récepteur à l'EGF. Ceci induit un rétrocontrôle négatif de la voie Ras/MAP Kinase. Mais les kinases ERKs, une fois activées peuvent aussi transloquer au noyau pour activer de nombreux facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes associés à la prolifération et à la survie (Figure 5).

2.3 L'implication de MEK/ERK dans la carcinogénèse colorectale

De nombreuses données rapportées sur la voie de signalisation RAS ont été obtenues à partir d'une surexpression des formes oncogéniques de KRAS, BRAF ou même de MEK1 dans des lignées cellulaires immortalisées d'origine intestinale (IEC-6, IEC-18, RIE-1) [Boucher *et al.*, 2004; Komatsu *et al.*, 2006; Oldham *et al.*, 1996].

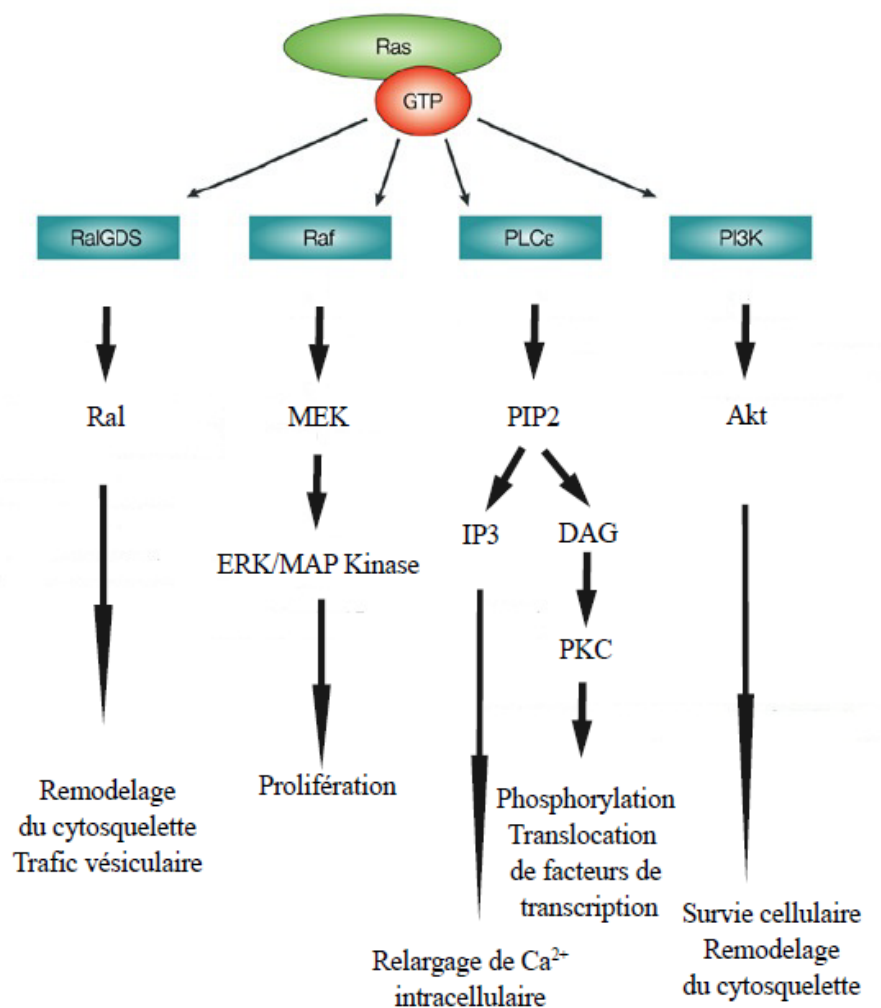


Figure 4: Principales voies de signalisation activées par la protéine RAS.

La protéine RAS-GTP active de multiples voies de signalisation telles que la voie RalGDS impliquée dans le remodelage du cytosquelette et le trafic vésiculaire, la voie PI3K/AKT impliquée principalement dans la survie et le remodelage du cytosquelette, la voie Raf/MEK/ERK impliquée également dans la survie cellulaire mais surtout dans la prolifération et l'activation des PLC qui vont permettre l'hydrolyse du PIP2 en IP3, entraînant le relargage du Ca²⁺ intracellulaire, et en DAG qui va activer les PKC et permettre la phosphorylation et la translocation nucléaire de certains facteurs de transcription. [Tiré et adapté de Cullen et Lockyer, 2002].

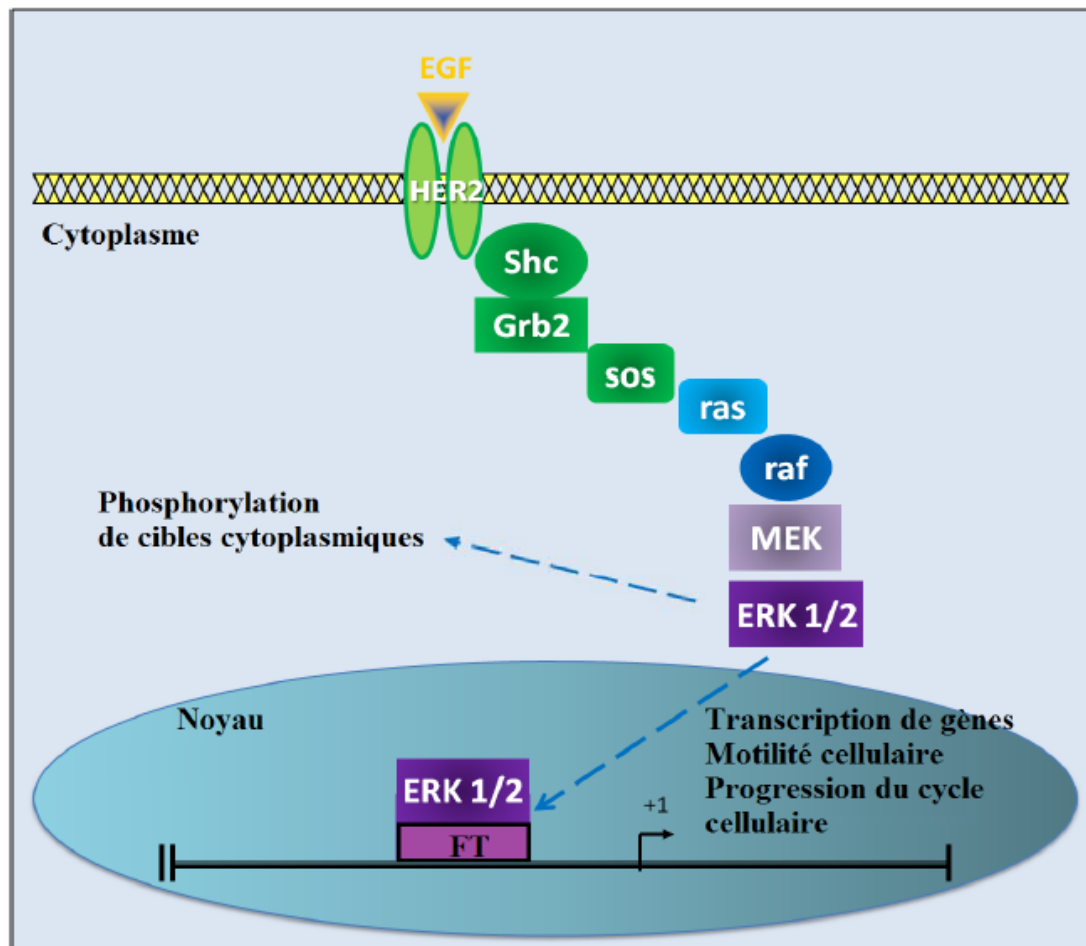


Figure 5: Voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK.

Des facteurs de croissance se fixent aux récepteurs tyrosine-kinase qui vont se dimériser et s'autophosphoryler permettant le recrutement de protéines adaptatrices comme GRB2 qui va recruter une protéine GEF (Guanosine Exchange Factors) comme SOS, permettant la liaison d'une molécule de GTP sur la protéine RAS et donc son activation. RAS va phosphoryler et activer la protéine kinase RAF. RAF va phosphoryler et activer les protéines kinase à double spécificité MEK. Les protéines kinases MEK vont phosphoryler les protéines kinases ERK qui vont pouvoir phosphoryler leur substrats cytoplasmiques ou transloquer au noyau et activer certains facteurs de transcription (FT) régularisant des gènes cibles impliqués dans la prolifération, la survie et la transformation cellulaire. [Tiré et adapté de Altieri et al., 2013].

C'est cette implication de l'hyperactivation des kinases MEK dans la carcinogénèse colorectale qui a plus particulièrement intéressé notre laboratoire dans les dernières années. Pour cela, un mutant de la protéine kinase MEK1 contenant des substitutions des sérines 218 et 222 en acide aspartiques, et entraînant une activation constitutive de la protéine, a été réalisé. Ce mutant a été par la suite exprimé de manière stable par infection rétrovirale dans deux lignées cellulaires épithéliales intestinales : les HIEC, des cellules humaines d'origine fœtale et non immortalisées et les IEC-6, des cellules de rat d'origine cryptale mais immortalisées. De manière intéressante, l'expression de la forme mutante de MEK1 dans les cellules HIEC induit un stress oncogénique qui se traduit par une sénescence prématurée associée à la surexpression de p53 et des inhibiteurs du cycle cellulaire p21 et p16^{INK4A}. À cet égard, l'entrée prématurée en sénescence dans les cellules normales est reconnue aujourd'hui comme une « barrière proliférative » s'opposant à l'immortalisation cellulaire et donc au développement tumoral. Au contraire, dans les cellules IEC-6, l'expression du mutant hyperactif de MEK1 induit leur transformation cellulaire qui se traduit par une prolifération à post-confluence et une capacité de croître en agarose mou. Cette réponse contradictoire des cellules IEC-6 par rapport aux cellules HIEC peut s'expliquer par l'immortalisation des IEC-6 qui entraîne la perte du programme de sénescence, et donc leur réponse proliférative à l'activation constitutive de la kinase MEK1 ainsi que leur transformation [Boucher *et al.*, 2004]. D'autres travaux réalisés, dans le laboratoire de la P^{re} N. Rivard et par d'autres équipes [Voisin *et al.*, 2008; Komatsu *et al.*, 2006] ont démontré que la surexpression de la forme constitutive active de MEK1 induit une transformation cellulaire de type épithélio-mésenchymateuse (EMT) associée à une perte d'expression des marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine et l'occludine [Lee *et al.*, 2006; Lemieux *et al.*, 2009]. En effet, les cellules transformées par MEK1 ou MEK2 ont perdu leur polarité épithéliale et ont acquis une capacité de migration et d'invasion dépendante de l'activité MEK [Lemieux *et al.*, 2009; Voisin *et al.*, 2008]. Lorsqu'elles sont injectées chez la souris immunodéficiente, ces cellules transformées ont la capacité de former des tumeurs sous-cutanées souvent dotées de capacités angiogéniques et métastatiques [Voisin *et al.*, 2008; Lemieux *et al.*, 2009].

Il est important de rappeler que l'EMT représente un type de plasticité cellulaire durant laquelle les cellules épithéliales intestinales perdent plusieurs de leurs caractéristiques épithéliales au profit de propriétés typiques des cellules mésenchymateuses. L'EMT est particulièrement importante lors de l'embryogénèse pour la formation des tissus [Baum *et al.*, 2008]. Cependant, une réactivation inappropriée de ce phénomène est souvent observée lors de la carcinogénèse, durant la transition de l'adénome bénin à l'adénocarcinome métastatique [Thiery, 2002]. En effet, l'EMT promeut l'invasion tumorale et la dissémination des métastases [Fang et Richardson, 2005]. Le changement moléculaire clé qui a lieu lors de l'EMT est une diminution de l'expression de la E-cadhérine, protéine localisée au niveau des jonctions adhérentes, réduisant l'adhésion cellule-cellule et entraînant ainsi une déstabilisation de la structure épithéliale [Guarino *et al.*, 2007; Peinado *et al.*, 2004]. Un certain nombre de facteurs de transcription régulent négativement l'expression de la E-cadhérine, notamment les produits des gènes *Snail1* et *Snail2* qui sont des répresseurs de la transcription de la E-cadhérine et sont impliqués dans l'EMT. Les travaux d'Étienne Lemieux dans le laboratoire de la P^{re} N. Rivard ont démontré que l'expression de *Snail1* est régulée par le facteur de transcription Egr-1 et l'expression de *Snail2* est régulée par le facteur de transcription Fra-1. Ces deux facteurs de transcription Egr-1 et Fra-1 sont des gènes de réponses précoces c'est-à-dire qu'ils sont rapidement induits suite à une stimulation *via* différents facteurs de croissance. Par ailleurs, Egr-1 et Fra-1 sont des substrats nucléaires des kinases ERKs qui lorsqu'elles transloquent au noyau vont induire leur activation [Lemieux *et al.*, 2009].

Les protéines kinases MEK1 et MEK2 ont 85% d'identité dans leur séquence en acides aminés et elles sont exprimées de manière ubiquitaire dans les lignées cellulaires et les tissus. L'activation constitutive des protéines kinases MEK1 et MEK2 est retrouvée dans près de 44% des cancers colorectaux, mais l'activation constitutive d'un des deux isoformes est suffisante pour induire la transformation des cellules épithéliales intestinales normales [Voisin *et al.*, 2008]. Une des conséquences les plus rapides liées à l'hyperactivation des kinases MEK est l'altération importante de l'expression de plusieurs gènes. En effet, quelques groupes ont réalisés des analyses de type Affymetrix afin

d'identifier les gènes différentiellement exprimés dans les cellules transformées par les formes mutantes des kinases MEK [Boucher et Rivard, résultats non publiés; Bergeron *et al.*, 2010; Komatsu *et al.*, 2006; Voisin *et al.*, 2008]. En effectuant une telle analyse dans les cellules IEC-6, l'équipe de la P^{re} N. Rivard a trouvé des modulations importantes dans l'expression de plusieurs gènes associés à la prolifération, à l'adhésion et la migration cellulaire. Parmi ces gènes, deux gènes ont retenu particulièrement l'attention de l'équipe puisqu'ils étaient induits de 30 fois pour le gène encodant l'inhibiteur de protéases à sérine serpine E2 [Bergeron *et al.*, 2010], et de 12 fois pour le gène encodant la kinase CDK8 (Figure 6).

3. La protéine kinase CDK8 et son rôle potentiel dans la carcinogénèse colorectale.

3.1 Historique

La protéine CDK8 est une sérine-thréonine kinase appartenant à la grande famille des protéines CDKs (Cycline Dépendante des Kinases). Ces protéines CDKs sont généralement connues pour réguler le cycle cellulaire avec leur partenaire cycline spécifique. Le partenaire cycline spécifique de CDK8 est la cycline C et leur complexe va agir principalement sur l'ARN polymérase II pour réguler la transcription (Figure 7). Le complexe CDK8/cycline C a été d'abord mis en évidence chez la levure par Liao *et al.*, (1995) sous le nom du complexe SRB10/SRB11. Tassan *et al.*, (1995) ont identifié aussi la protéine CDK8 chez les vertébrés grâce à son interaction avec la protéine cycline C. Pendant longtemps la protéine CDK8 a été considérée comme un régulateur négatif de la transcription *via* son association avec le complexe Mediator. L'initiation de la transcription s'effectue grâce à un gros complexe multiprotéique, le complexe de pré-initiation (PIC), composé de l'ARN polymérase II, mais aussi des facteurs généraux de transcription (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF et TFIIH) et du complexe Mediator.

	<u>caMEK/wtMEK</u>
<u>Proliferation</u>	
MAP Kinase kinase 7 γ	0.3
Transforming growth factor beta 1 4 (Tgfb14)	0.5
Mitogen-activated protein kinase 6	2.8
Cyclin D1	2.9
Cell division protein kinase 8	12
<u>Adhesion and cell migration</u>	
Metalloproteinase inhibitor 3	0.2
Cadherin 3	0.2
Topomyosin 1, alpha	0.3
Collagen alpha 1 chain precursor	0.3
Procollagen, type 1, alpha 2	0.3
Syndecan 2	0.5
Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	0.5
Myosin heavy chain IX	0.5
Prolyl 4-hydroxylase alpha-1 subunit	0.5
Procollagen C-proteinase enhancer protein	0.5
Procollagen type V, alpha 2	0.5
Bone/cartilage proteoglycan 1 precursor	0.6
Cadherin 11	0.6
Lectin, galactose binding soluble 1	2.8
Actin-like protein 2	2.5
Keratin complex 2, basic, gene 8	2.5
Plasminogen activator (Plat)	2.7
Syndecan 1	3.5
CD9	4.2
Integrin alpha-6 precursor	4.6
Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B	8.6
Procollagen type VI, alpha 2	9.1
Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E	30

Figure 6: Liste des gènes associés à la prolifération, à l'adhésion et à la migration modulés par l'activation constitutive de la kinase MEK1.

L'expression des gènes différentiellement induits dans les cellules IEC-6 exprimant de manière stable la forme hyperactive de MEK1 ou sa forme sauvage a été déterminée par micropuce ADN de rat (Boucher, Asselin et Rivard, résultats non publiés). Un rapport d'expression a été établi pour chaque gène exprimé dans les cellules exprimant la forme hyperactive de MEK (MEKca) versus la forme sauvage (MEKwt). Seuls les gènes associés à la prolifération ainsi qu'à l'adhésion et à la migration cellulaire sont montrés [Boucher et Rivard, résultats non publiés].

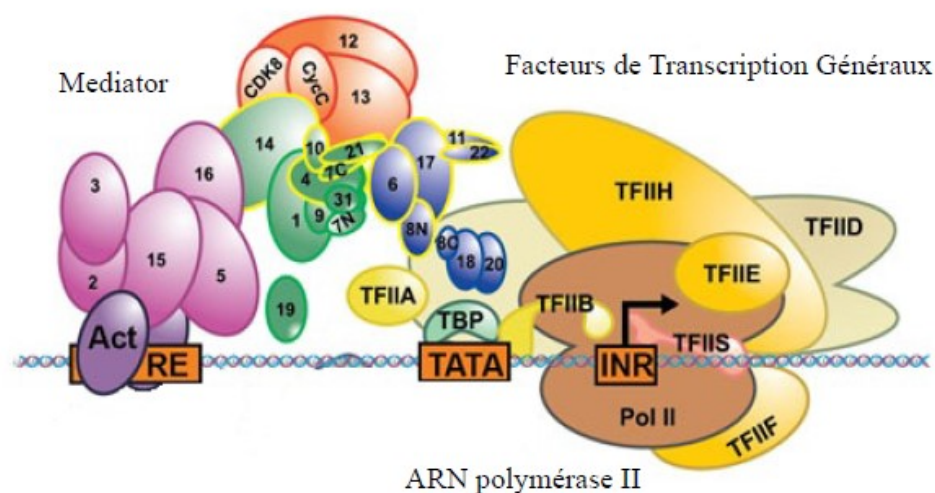


Figure 7: Complexe de pré-initiation et ses composantes.

Le complexe Mediator fait le pont entre les activateurs (Act) liant les éléments de régulation sur l'ADN (RE) et la machinerie transcriptionnelle (ARN polymérase II et facteurs de transcription généraux). Le Mediator est représenté par les sous-unités bleues (tête), vertes (corps), magenta (queue) et orange (module CDK8). Le module CDK8 qui porte l'activité kinase du complexe Mediator est composé des protéines CDK8, cycline C, MED12 et MED13. [Tiré et adapté de Seizl et al., 2011].

Ce complexe Mediator est composé de deux modules : le *core* Mediator composé de 25 sous-unités protéiques (1.2MDa) et qui n'a pas de fonction enzymatique connue, et le module CDK8 composé des protéines CDK8, cycline C, MED12 et MED13 qui peut se fixer de façon réversible au *core* Mediator, et apporte une activité enzymatique au complexe [Furumoto *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2008; Knuesel *et al.*, 2009]. Et c'est Rickert *et al.*, (1999) qui ont mis en évidence son rôle de CTD (C-Terminal Domain)-kinase.

3.2 CDK8 régulateur négatif de la transcription

La liaison du module CDK8 au *core* Mediator entraîne un changement conformationnel du complexe. Et ce changement conformationnel du complexe va pouvoir inhiber sa fonction de co-activateur de la transcription, en empêchant l'association du complexe Mediator avec l'ARN polymérase II indispensable à l'initiation de la transcription. Cette action du module CDK8 est indépendante de son activité kinase [Xu et Ji, 2001]. Mais la répression de la transcription par la protéine CDK8 peut également se faire dépendamment de son activité kinasique : soit 1) par phosphorylation du domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II sur une séquence consensus (YSPTSPS) empêchant son interaction avec le complexe Mediator [Furumoto *et al.*, 2007], 2) par phosphorylation de la cycline H, une sous-unité du facteur de transcription TFIIF, empêchant son recrutement au complexe de pré-initiation [Galbraith *et al.*, 2010] ou 3) par recrutement d'histone méthyltransférases qui peuvent réprimer certains gènes, [Donner *et al.*, 2010].

Ce rôle de régulateur négatif du module CDK8 est particulièrement important lors du développement embryonnaire. En effet, les souris *cdk8*^{-/-} ne survivent pas au-delà du stade embryonnaire E2.5-E3.0. CDK8 semble particulièrement important dans la compaction et l'implantation de l'embryon en régulant des voies de signalisation impliquées dans le développement telles que les voies Wnt ou Hedgehog qui induisent la différenciation et la détermination cellulaire [Westerling *et al.*, 2007].

3.3 CDK8 régulateur positif de la transcription

Des études plus récentes montrent cependant un rôle positif de CDK8 dans la transcription (Figure 8). Par exemple, CDK8 contrôle la transcription des gènes de réponse précoce (IEGs). Ces gènes de réponse précoce sont les premiers gènes activés suite à une stimulation par des facteurs de croissance [Donner *et al.*, 2010]. Suite à la réalisation d'un microarray sur des cellules cancéreuses humaines HCT116, dans lesquelles l'expression de CDK8 fut inhibée par 80-90% *via* un shARN, il a été démontré que CDK8 jouait un rôle important dans l'expression optimale de plusieurs gènes de réponse précoce tel que *FOS*, *EGR1*, *EGR2* et *EGR3* [Donner *et al.*, 2010]. De manière intéressante, ces gènes sont des oncogènes activés suite à l'activation des kinases ERKs suite à une stimulation au sérum et par des facteurs de croissance [Davis, 1995]. Suite à des analyses d'immunoprécipitation de la chromatine, il a été mis en évidence que CDK8 n'était pas nécessaire au recrutement de l'ARN polymérase II mais agissait en phosphorylant son domaine C-terminal [Donner *et al.*, 2010]. Or, la phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II sur les sérines 5 et 2 est liée au détachement de celle-ci du promoteur et à l'initiation de la phase d'élongation de la transcription [Marshall *et al.*, 1996]. CDK8 est connu pour phosphoryler ces sérines 2 et 5 *in vitro* [Rickert *et al.*, 1999]. De plus CDK8 facilite le recrutement de la sous-unité PTEF-b, permettant l'initiation de l'élongation de la transcription des IEGs [Donner *et al.*, 2010]. De manière intéressante, il a également été mis en évidence que CDK8 intervenait dans la transcription des gènes associés à l'hypoxie et qui sont sous la dépendance du facteur de transcription HIF1 α [Galbraith *et al.*, 2013]. En effet, les facteurs de transcription HIFs (Hypoxia Inducible Factor) induisent la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'angiogenèse, la glycolyse, l'adaptation métabolique, l'érythropoïèse et la survie cellulaire [Semenza, 2012]. Mais pour permettre l'activation de ces gènes, HIF1 α nécessite la présence d'un co-activateur, soit CDK8. Ce co-activateur intervient dans la régulation positive de l'activité de l'ARN polymérase II dans la phase d'élongation de la transcription des gènes cibles de HIF1 α , sans affecter son recrutement aux promoteurs des gènes cibles [Galbraith *et al.*, 2013].

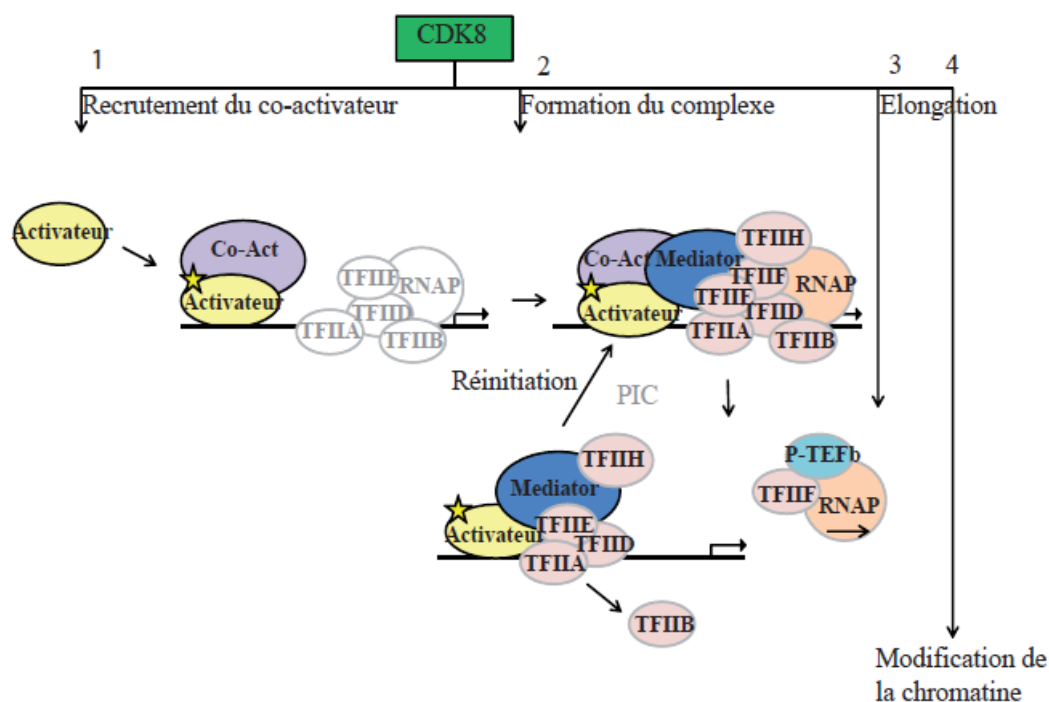


Figure 8: Régulation positive de la transcription par CDK8.

Modèle de la régulation positive de la transcription par CDK8. CDK8 peut promouvoir la transcription soit 1) en facilitant le recrutement de co-activateur sur des facteurs de transcription, 2) CDK8 peut coopérer avec CDK7 pour permettre la formation du complexe de pré-initiation (PIC), durant plusieurs tours de transcription, 3) CDK8 joue un rôle dans la phase d'élongation de la transcription en permettant le recrutement de P-TEFb, 4) CDK8 peut contribuer à des modifications de la chromatine permettant l'activation transcriptionnelle. [Tiré et adapté de Galbraith et al., 2010].

3.4 CDK8 et cancer colorectal

Plus récemment, un rôle oncogénique pour la protéine CDK8 a été suggéré dans le cancer colorectal. D'abord, l'expression du gène encodant pour CDK8 est augmentée dans une majorité de tumeurs colorectales. De plus, les patients surexprimant CDK8 ont un moins bon pronostic de survie comparativement aux patients ne présentant pas cette surexpression [Seo *et al.*, 2010]. Il faut mentionner que le gène codant la protéine CDK8 est localisé sur le bras long du chromosome 13, une région connue pour être régulièrement altérée dans les cancers colorectaux. En accord avec cela, il a été observé un gain de copie du gène CDK8 dans près de 62% des cancers colorectaux [Seo *et al.*, 2010] ainsi que dans plusieurs lignées cancéreuses colorectales connues [Firestein *et al.*, 2008]. De manière intéressante, l'inhibition de l'expression de CDK8 par l'expression d'un shARN spécifique entraîne un ralentissement de la prolifération de plusieurs lignées cancéreuses colorectales humaines.

Ce ralentissement de prolifération serait attribuable à la baisse de l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine/TCF4, causée par CDK8. En effet, la présence de CDK8 permettrait le recrutement de la machinerie transcriptionnelle aux promoteurs des gènes cibles dépendants du complexe transcriptionnel β -caténine/TCF4. De plus, CDK8 interagirait directement avec E2F1 et entrainerait sa phosphorylation, inhibant ainsi son potentiel transcriptionnel [Morris *et al.*, 2008]. E2F1 est un facteur de transcription capable d'inhiber la transcription dépendante du complexe β -caténine/TCF4.

La fonction oncogénique de CDK8 fut mise en évidence par sa surexpression dans des fibroblastes murins immortalisés (NIH3T3). En effet, la surexpression de la protéine sauvage de CDK8 dans ces cellules induit la formation de foyers, la croissance de colonies dans des conditions d'indépendance d'ancrage et la formation de tumeurs lorsqu'elles sont injectées dans des souris immunodéficientes. Ce rôle oncogénique de la protéine dépend de son activité kinase, puisque lorsque une forme mutante de CDK8 au niveau de son domaine

kinasique, la rendant inactive, est surexprimée dans les cellules NIH3T3, aucune transformation oncogénique n'est observée [Firestein *et al.*, 2008]. De plus, il a été mis en évidence que l'expression de CDK8 est aussi requise pour la croissance tumorale *in vivo* [Adler *et al.*, 2012] en maintenant les cellules tumorales dans un état dédifférenciées, et en régulant l'expression d'un certains nombres de gènes généralement exprimés dans des cellules souches embryonnaires pluripotentes [Adler *et al.*, 2012]. CDK8 jouerait donc un rôle dans l'établissement de la tumorigénèse mais également dans le maintien des cellules tumorales dans un état indifférencié. En effet, une inhibition de l'expression de CDK8 dans des cellules cancéreuses colorectales induit une diminution significative de l'expression des gènes liés aux cellules souches embryonnaires, dont la majorité sont dépendant de *MYC*. Ce rôle de CDK8 dans la régulation des gènes cibles dépendants de *MYC* se retrouve justement dans les tumeurs présentant un mauvais pronostic et une faible différenciation [Adler *et al.*, 2012].

CDK8 régule également l'expression de gènes cibles de la voie Notch, en phosphorylant le domaine intracellulaire de Notch [Fryer *et al.*, 2004]. CDK8 peut également induire la phosphorylation des protéines SMADs, permettant l'expression des gènes cibles de la voie TGF- β /BMP [Alarcon *et al.*, 2009].

4. Hypothèse et objectifs

Considérant que son expression génique est induite de près de 12 fois dans des cellules épithéliales intestinales transformées par la forme hyperactive de MEK1, nous avons posé comme hypothèse que CDK8 est nécessaire au potentiel oncogénique de la voie KRAS/MAP Kinase, une voie potentiellement hyperactivée dans une majorité des cancers colorectaux suite à des mutations gain-de-fonction dans les oncogènes *KRAS* et *BRAF*.

Afin de répondre à cette hypothèse, nous nous sommes fixés deux objectifs :

1- Déterminer l'expression de CDK8 dans des tumeurs colorectales de patients, dans des lignées cancéreuses colorectales humaines ainsi que dans des modèles de transformation oncogénique plus simple, soient des cellules épithéliales intestinales transformées par les oncogènes KRAS, BRAF ou l'expression du mutant de MEK1 constitutivement actif.

2- Analyser la contribution de CDK8 dans la transformation des cellules épithéliales intestinales induite par les oncogènes KRAS, BRAF ou MEK1. Ceci en utilisant la technique de l'ARN interférent afin de déterminer l'impact de l'inhibition de CDK8 sur les différentes caractéristiques de la transformation oncogénique : la prolifération, le potentiel de croissance en indépendance d'ancrage et la morphologie.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires colorectales humaines avec des mutations dans l'oncogène *KRAS* (LoVo, SW480, SW620, DLD-1, HCT116), dans l'oncogène *BRAF* (HT-29, Colo 205, RKO) ou dans d'autres gènes tels que *APC*, *TP53* ou *EGRF* (Caco-2, SNU C1, SW48), et la lignée épithéliale intestinale normale humaine non immortalisée HIEC d'origine fœtale [Perreault et Beaulieu, 1998] ont été cultivées tel que décrit dans le tableau 1. Les cellules IEC-6 exprimant de manière stable pBabe (vecteur vide), pBabe-*KRAS*^{G12V}, pLXIN-MEKwt et pLXIN-MEKca ont été générées dans notre laboratoire et décrites précédemment [Lemieux et al., 2009; Cagnol et Rivard, 2013]. Ces lignées ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant 4.5 g/L de Glutamax, 1 M HEPES, 50 unités de pénicilline, 50 µg de streptomycine et 5% sérum de veau fœtal (FBS). Les cellules IEC-6 *BRAF*^{V600E}ER, générées et décrites précédemment [Cagnol et Rivard, 2013], ont été cultivées dans du DMEM sans rouge de phénol, supplémenté de 4.5 g/L Glutamax, 1 M HEPES, 50 unités de pénicilline, 50 µg de streptomycine 5% de FBS dépourvu d'hormones (Valley Biomedica inc., Winchester, VA). L'activité de l'oncogène *BRAF*^{V600E} dans les cellules IEC-6 *BRAF*^{V600E}ER est induite par addition de tamoxifène (Figure 9). Pour les productions virales, les cellules de rein embryonnaire 293T ont été cultivées dans du milieu DMEM avec 4.5 g/L Glutamax, 1 M HEPES, 50 unités de pénicilline, 50 µg de streptomycine et 10% FBS.

2. Infection lentivirale

Afin d'inhiber l'expression de CDK8, un shARN fut *designer* [Chevalier-Soudeyns, non publiés], en choisissant des séquences de 21 nucléotides ciblant à la fois le gène humain, murin et de rat, *via* une analyse bio-informatique. Plusieurs séquences ont été mises en évidence et insérée dans une séquence de nucléotides permettant l'expression du

shARN. L'un des shARN dirigé contre CDK8 ainsi que le shARN contrôle (Tableau 2) ont été clonés dans le vecteur d'expression plenti-U6-puro (adapté d'Invitrogen Carlsbad, CA, États-Unis). Les cellules 293T ont été ensemencées à une confluence de 5 000 000 de cellules dans un pétri de 100 mm, et transfectées avec les constructions shARN par lipofection (Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, États-Unis). 48 µL de Lipofectamine 2000 ont été dilués dans 1.5 mL de milieu OptiMEM (Gibco®, Life technologies, Carlsbad, CA, États-Unis) supplémenté de 4.5g/L Glutamax, et 1 M HEPES et incubés pendant 5 min à température ambiante. En parallèle, 6 µg du plasmide contenant les constructions exprimant les shARN ont été dilués dans 1.5 mL de milieu OptiMEM, avec 6 µg des plasmides exprimant les protéines d'encapsidation des lentivirus plp1, plp2 et plp_{vsvg}. Le mélange contenant la Lipofectamine 2000 a été ajouté au mélange contenant les ADN et incubé 20 min à température ambiante. Le milieu de culture des cellules 293T a été remplacé par du milieu OptiMEM avant d'ajouter le mélange de transfection. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C pendant 4 h, avant d'ajouter du milieu de culture standard pour une incubation pendant 2 jours à 37°C avant la récolte des surnageants contenant les particules virales. Les différentes lignées IEC-6 à infecter ont été ensemencées dans une plaque 6 puits à une confluence de 30 à 40%. Le lendemain, le milieu de culture a été retiré et remplacé par du milieu contenant les virus et 4 µg/mL de polybrène. Les cellules ont été incubées pendant 1 h à 37°C, avant d'ajouter du milieu de culture contenant du polybrène. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 2 jours à 37°C. Après ces 2 jours d'incubation, les cellules infectées ont été sélectionnées par addition de 2.5µg/mL de puromycine.

3. Immunobuvardage

Les échantillons déposés sur les gels de polyacrylamide ont été obtenus par lyse des cellules dans un tampon Laemli composé de Tris-HCl (250 mM, pH 6.8), de SDS (32 mM) et de glycérol (40%). Les lysats ont ensuite été dosés par la méthode BCA en se référant à une courbe standard réalisée *via* différentes concentrations d'albumine de sérum bovin (BSA).

Tableau 1 : Description des différentes lignées cancéreuses colorectales humaines utilisées et leur méthode de culture.

Lignées Cellulaires	Origine	Atmosphère	Milieu de culture	Glutamax (Gibco by Lifetechnologies)	Hepes (Wisent inc.)	Pénicilline (Wisent inc.)	Streptomycine (Wisent inc.)	FBS (Wisent inc.)
LoVo	Adénocarcinome épithéliales adhérentes	5% CO2	Ham's F12	4.5g/L	1M	50 unités	50µg	10%
SW480	Adénocarcinome épithéliales adhérentes	5% CO2	DMEM	4.5g/L	1M	50 unités	50µg	10%
SW620	Métastases d'un adénocarcinome épithéliales adhérentes	5% CO2	DMEM	4.5g/L	1M	50 unités	50µg	10%
DLD-1	Adénocarcinome épithéliales adhérentes	5% CO2	RPMI 1640	4.5g/L	1M	50 unités	50µg	10%
HCT 116	Carcinome épithéliales adhérentes	5% CO2	McCoy 5A	4.5g/L	1M	50 unités	50µg	10%
HT-29	Adénocarcinome épithéliales adhérentes	5% CO2	McCoy 5A	4.5g/L	1M	50 unités	50µg	10%
Colo 205	Adénocarcinome épithéliales mixées adhérentes et en suspension	5% CO2	RPMI 1640	4.5g/L	1M	50 unités	50µg	10%
RKO	Carcinome épithéliales adhérentes	5% CO2	EMEM	4.5g/L	1M	50 unités	50µg	10%
Caco-2	Adénocarcinome épithéliales adhérentes	5% CO2	DMEM	4.5g/L	1M	50 unités	50µg	10%
SW 48	Adénocarcinome épithéliales adhérentes	5% CO2	DMEM	4.5g/L	1M	50 unités	50µg	10%
SNU C1	Adénocarcinome épithéliales en suspension	5% CO2	RPMI 1640	4.5g/L	1M	50 unités	50µg	10%
HIEC	Fœtale épithéliales normales adhérentes	5% CO2	Opti Mem	4.5g/L	1M	50 unités	50µg	5%+ 0.2 UI/mL insuline

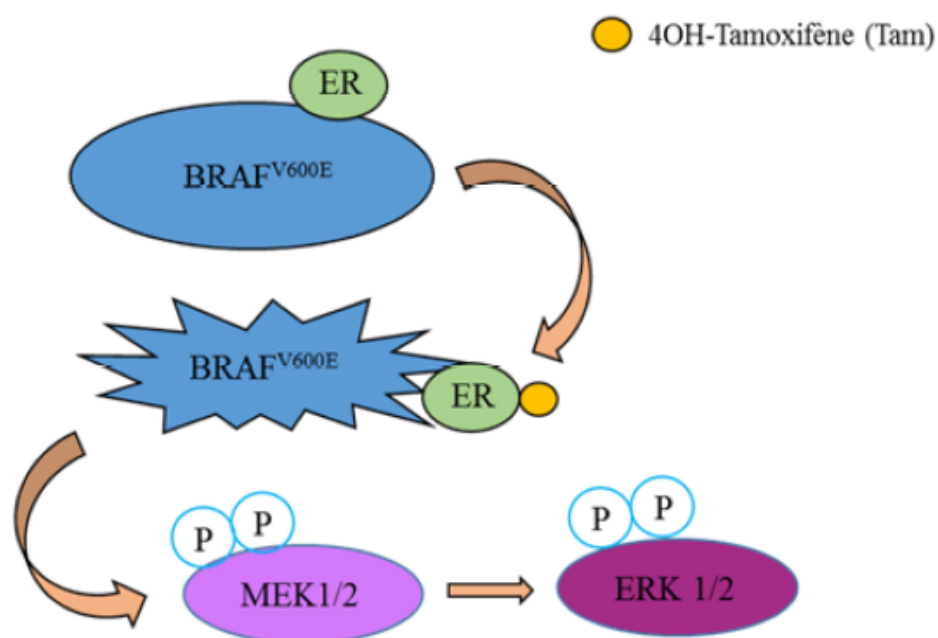


Figure 9: Induction de l'oncogène BRAF^{V600E} dans les IEC-6 BRAF^{V600E}ER.

La forme oncogénique de BRAF est couplée au domaine de liaison au ligand du récepteur de l'estradiol, masquant son activité en absence de stimulation. L'ajout d'estradiol ou de tamoxifène entraîne un changement de conformation de la protéine, dévoilant l'activité oncogénique [Cagnol et Rivard, 2013]. Cette activation de BRAFV600E oncogénique induit l'activation constitutive de signalisation en aval soit des kinases MEK1/2 et ERK1/2 [Cagnol et Rivard, 2013].

Suite à ce dosage, 25 µg de protéines ont été déposées sur un gel de polyacrylamide, dont la concentration varie suivant le poids moléculaire des protéines d'intérêt, et séparées par électrophorèse. Les protéines ont été transférées du gel de polyacrylamide sur une membrane PVDF, qui a été colorée au rouge ponceau, afin de valider la qualité du dosage et du transfert des protéines. La membrane a ensuite été incubée pendant 1 h dans une solution de blocage (5% de lait en poudre dilué dans du PBS-Tween 0.05%) afin de saturer les sites d'interaction aspécifique des anticorps utilisés. Puis la membrane a été incubée avec l'anticorps primaire contre la β -actine, ERK2, les formes phosphorylées de ERK1/2 (pERK1/2), la E-cadhérine, la paxilline ou CDK8 (Tableau 3) à la dilution appropriée, dans la solution de blocage pendant la nuit à 4°C. La membrane a ensuite été lavée 3 fois 5 min dans du PBS-Tween 0.05% et incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase ou à la phosphatase alcaline dilué à une concentration adéquate dans la solution de blocage. La membrane a été à nouveau lavée 3 fois 5 min avec du PBS-Tween 0.05%. Les protéines d'intérêt ont été révélées par chemiluminescence sur des films autoradiographiques (Denville Scientific Inc., Saint-Laurent, QC, Canada).

4. Extraction d'ARN

L'ARN total à partir de cellules animales a été isolé à l'aide de la trousse Qiagen RNeasy® Mini Kit (Venlo, Province de Limbourg, Pays-Bas). Brièvement, les cellules ont été lysées dans du tampon RLT (tampon contenant une forte concentration de guanidine isocyanate, afin de lier l'ARN à la membrane de silice) contenant du β -mercaptoéthanol (10 µL de β -mercaptoéthanol dans 1 mL RLT). Le lysat cellulaire a ensuite été complété avec un volume d'éthanol 70%. Ce mélange a été transféré sur les colonnes RNeasy®, puis centrifugé. Un premier lavage a été effectué avec le tampon RW1, qui contient un sel de guanidine et de l'éthanol, suivi de 2 lavages avec le tampon RPE majoritairement composé d'éthanol. Après une dernière centrifugation, l'ARN a été élué avec de l'eau. L'ARN élué a subi une dernière étape de purification par un traitement à la DNase (Roche, Laval, QC, Canada) afin d'éliminer l'ADN génomique contaminant, pendant 20 min à 37°C. L'enzyme a ensuite été inhibée par l'ajout d'EDTA (50 mM, pH 8.0) et une incubation de 10 min à

75°C. La qualité des ARNs a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 1% et la quantité dosée au Nanodrop 2000c (Thermo Scientific Spectrophotometer).

5. RT-PCR et qPCR

Un µg d'ARN a été ajouté à 4 µL de tampon AMV RT 5X (Roche, Laval, QC, Canada), 0.8 µL 25 mM dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA, États-Unis), 1 µL oligodT 16 nt (100 mM), 0.6 µL Protector RNase inhibitor 40 U/µL (Roche, Laval, QC, Canada), 0.5 µL de *reverse transcriptase* AMV (21 U/µL) et complété par addition d'eau pour un volume final de 20 µL. L'ARN a tout d'abord été ajouté à l'eau et le mélange a été incubé 5 min à 75°C afin de dénaturer les ARNs puis 5 min à 4°C. Le reste des réactifs a été ensuite ajouté et le mélange incubé pendant 1 h à 42°C. Une fois la réaction terminée, 20 µL d'eau ont été ajoutés afin de diluer les ADN complémentaires à une concentration de 25 ng/µL. Afin de valider l'efficacité de la transcription inverse, nous avons réalisé des PCR semi-quantitatives avec des oligonucléotides pour amplifier le gène de référence *rtbp* (sens 5'-TTC AGT TCT GGG AAA ATG GTG-3' et anti-sens 5'-GGA GAA CAA TTC TGG GTT TGA-3'), selon les conditions suivantes : 2 min de dénaturation à 95°C, puis 30 cycles où se répètent 30 secondes de dénaturation à 95°C, de 45 s d'hybridation à 59°C et de 20 secondes de polymérisation à 72°C, pour finir par une étape de 5 min à 72°C. Puis les ADN complémentaires ont été envoyés à la plateforme de RNomique de l'Université de Sherbrooke, afin d'analyser l'expression quantitative des gènes d'intérêt, notamment *hCDK8* par rapport aux gènes de références *MRPL19*, *SDHA* et *YWHAZ* et *rcdk8 snail1*, *snail2* et *gem* par rapport aux gènes de références *Pum1*, *Rpl19* et *Tubb5*.

Tableau 2: Séquence des amorces d'oligonucléotides du shARN dirigé contre CDK8 et son contrôle non ciblant le shSCR.

Nom	Séquence 5'-3'
shCtrl – sens	GAT CCC GGA GGG TGC AAA CGC AAC T
shCtrl – antisens	TCG AGT TCC AAA AAA GGA GGG TCG AA
shCDK8 – sens	GAT CCC AAG TGA AGC TGA GCA GCG A
shCDK8 – antisens	TCG AGT TCC AAA AAA AAG TGA AGC TG

Tableau 3: Liste des anticorps utilisés dans les différentes expérimentations réalisées.

Nom	Espèce	Dilution	Compagnie
α -CDK8	chèvre	1/750	Santa Cruz Biotechnology Inc. (USA)
α -ERK2 (C14)	lapin	1/5000	Santa Cruz Biotechnology Inc. (USA)
α -chèvre HRP	âne	1/3000	Santa Cruz Biotechnology Inc. (USA)
α -pERK1/2	souris	1/5000	Sigma-Aldrich (CA)
α -actine	souris	1/10000	Millipore (CA)
α -E-cadhérine	souris	1/2000	BD Transduction Laboratories (CA)
α -souris HRP	mouton	1/10000	GE Healthcare UK Limited (CA)
α -lapin HRP	âne	1/10000	GE Healthcare UK Limited (CA)
α -souris PA	chèvre	1/10000	Promega (CA)
α -lapin PA	chèvre	1/10000	Promega (CA)
α -phalloïdine	couplé FITC PDS282	1/400	Sigma-Aldrich (CA)
α -paxilline	souris	1/250	BD Transduction Laboratories (CA)
α -souris-rhodamine	âne	1/400	Alexa Fluor 568 Life Technologies (CA)

6. Immunofluorescence

Le lendemain de l'ensemencement de 60 000 cellules par lamelles, les cellules ont été lavées deux fois au PBS froid puis fixées dans une solution de paraformaldéhyde diluée à une concentration de 3% dans du PBS, pendant 20 min à température ambiante. Puis les cellules ont été perméabilisées après 3 lavages au PBS dans une solution de Triton 0.1% dilué dans du PBS, pendant 10 min à température ambiante. Ensuite, les lamelles ont été incubées après 3 lavages au PBS dans une solution de blocage contenant 2% de BSA dilué dans du PBS, pendant 30 min à température ambiante, avant d'incuber les lamelles avec les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage pendant la nuit à 4°C. Ensuite, après 3 lavages au PBS, les lamelles ont été incubées avec l'anticorps secondaire dilué dans la solution de blocage, pendant 30 min à température ambiante. Puis, les lamelles ont été incubées pendant 1 min dans une solution de DAPI (1/75000) après 3 lavages au PBS. Enfin, les lamelles ont été montées sur des lames avec le milieu de montage Immu-Mount (Thermo Scientific, Waltham, MA, États-Unis). Pour la visualisation de la F-actine en immunofluorescence, nous avons utilisé la phalloïdine couplé au FITC qui a une forte affinité pour celle-ci.

7. Analyse de la prolifération

Le lendemain de l'ensemencement de 100 000 cellules par lamelles, les cellules BRAF^{V600E}ER exprimant ou non un shARN contre CDK8 ont été incubées pendant 2 h à 37°C avec du BrdU (Invitrogen, Carlsbad, CA, États-Unis) dilué à une concentration de 1% dans du milieu de culture. Le BrdU (bromodéoxyuridine) s'incorpore à l'ADN nouvellement synthétisé dans les cellules en répllication. Suite à cette incubation, les lamelles ont été lavées 3 fois 5 min dans du PBS froid, avant une fixation des cellules avec une solution composée de 7 volumes d'éthanol 100% et de 3 volumes de glycine (50 mM, pH 2), pendant 45 min à température ambiante. Les cellules ont ensuite été perméabilisées, après 2 lavages au PBS, dans une solution d'acide chloridrique (HCl) à une concentration 4

N, pendant 15 min à température ambiante. Les lamelles ont été de nouveau lavées 3 fois 5 min dans du PBS ou jusqu'à ce que le pH soit supérieur à 6.5. Les lamelles ont alors été incubées dans une solution de blocage composée de BSA 0.5% et de Tween 0.1% diluée dans du PBS, pendant 10 min à température ambiante. Ensuite, les lamelles ont été incubées avec l'anticorps anti-BrdU (Roche, Laval, QC, Canada), pré-couplé à une molécule de FITC, dilué dans la solution de blocage à une concentration de 1/50, pendant 45 min à 37°C. Les lamelles ont ensuite été montées sur des lames avec le milieu de montage Immu-Mount (Thermo Scientific, Waltham, MA, États-Unis) après 3 nouveaux lavages au PBS. L'analyse de la prolifération a aussi été effectuée par décompte cellulaire des cellules IEC-6 MEKwt et MEKca exprimant de manière stable un shARN contrôle ou un shARN dirigé contre CDK8 pour inhiber son expression. Dans cette expérience, 30 000 cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits, puis les cellules ont été dénombrées tous les deux ou trois jours, jusqu'à l'atteinte de la confluence.

8. Analyse de la capacité de croissance en indépendance d'ancrage

L'agarose (Agarose low gelling temperature, SIGMA-Aldrich, Saint-Louis, MI, États-Unis) a été dilué dans du PBS à une concentration de 1.4% puis stérilisé. L'agarose a été liquéfié à une température de 40°C, et mélangé avec du milieu de culture DMEM contenant des quantités doubles de GlutaMAX, HEPES, pénicilline, streptomycine et FBS par rapport au milieu de culture habituel. Un mL de 50% d'agarose et de 50% de milieu de culture a été déposé dans chaque puits d'une plaque 6 puits. 20 000 cellules contenues dans un mélange de 1 mL d'agarose et 1 mL de milieu ont ensuite étéensemencées par puits. . Le milieu a été changé aux 2 jours avec du milieu de culture. Après quelques semaines, les cellules ont été marquées au MTT (0.5 mg/mL) dissous dans du milieu de culture, pendant 3 h à 37°C. Le nombre de cellules viables a été déterminé par le logiciel d'image Image J.

RÉSULTATS

1. Expression de CDK8 dans des tumeurs colorectales, dans des lignées cancéreuses colorectales humaines en culture et dans les cellules IEC-6 transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase.

Dans le but de répondre à notre hypothèse, nous avons analysé l'expression de CDK8 dans des spécimens de tumeurs prélevées chez des patients atteints de cancer colorectal, mais également dans des lignées cellulaires cancéreuses colorectales humaines, ainsi que dans des lignées cellulaires d'origine intestinale simplement transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase. Nous avons donc procédé à des expériences d'immunobuvardage pour quantifier l'expression protéique de CDK8, ainsi qu'à des analyses de PCR quantitative pour quantifier son expression en ARNm.

1.1 Expression de CDK8 dans des tumeurs de patients atteints de cancer colorectal.

Une étude antérieure a déjà rapporté que le gène codant pour CDK8 situé sur le bras long du chromosome 13 était amplifié dans le cancer colorectal [Firestein *et al.*, 2008]. Nous avons donc analysé l'expression protéique de CDK8 dans 15 tumeurs colorectales paires avec du tissu sain adjacent et ce, par immunobuvardage. De plus, nous avons évalué l'expression protéique de CDK8 dans des spécimens à différents stades de la carcinogénèse soit de l'adénome à l'adénocarcinome de stade 4. Nos résultats montrent que CDK8 est surexprimé (d'environ 3 fois) dans toutes les tumeurs en comparaison avec la marge saine et ce, indépendamment des stades de cancers (Figure 10).

1.2 Expression de CDK8 dans les lignées cancéreuses colorectales humaines.

Nous avons analysé l'expression de CDK8, par immunobuvardage, dans différentes lignées cancéreuses colorectales humaines et ce, en comparaison avec les cellules HIEC, qui sont des cellules épithéliales intestinales normales humaines d'origine fœtale. Nous avons différencié ces lignées selon la présence ou non de mutations dans les oncogènes *KRAS* ou *BRAF*. La Figure 11A montre dans un premier temps que CDK8 est surexprimée dans toutes les lignées cancéreuses colorectales en comparaison aux HIEC (d'environ 2 ou 3 fois) et ce, indépendamment du statut mutationnel de *KRAS* ou *BRAF*. Afin de vérifier si l'expression de CDK8 pouvait être en partie contrôlée par la voie MAP Kinase, nous avons aussi procédé à un traitement de ces lignées cancéreuses colorectales humaines avec l'inhibiteur pharmacologique de MEK, le U0126 (20µM pendant 48h). De manière intéressante, nous avons pu alors constater que le traitement au U0126 induisait une diminution de l'expression protéique de CDK8 dans la majorité des lignées suggérant que la surexpression de CDK8 dans ces lignées cancéreuses colorectales humaines est, en partie, dépendante de la signalisation MEK/ERK (Figure 11A). Nous avons également analysé l'expression de CDK8 en ARNm, dans ces lignées suivant le traitement au U0126, afin de déterminer si la régulation de l'expression de CDK8 par la voie MEK/ERK était transcriptionnelle et ce, par PCR quantitative. Nous avons pu constater que les niveaux d'ARNm de CDK8 dans ces lignées suivant le traitement U0126, ne sont pas affectés significativement, suggérant que la régulation de l'expression protéique de CDK8 dans ces lignées n'est pas modulée de façon transcriptionnelle (Figure 11B).

1.3 Expression de CDK8 dans les cellules épithéliales intestinales transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase.

Outre leurs mutations dans les oncogènes *KRAS* et *BRAF*, les lignées cancéreuses colorectales utilisées démontrent de nombreuses autres altérations génétiques telles que des mutations dans les gènes *APC*, *TGFBR1*, *TP53* ou démontrent de l'instabilité au niveau des microsatellites. Afin de vraiment vérifier si l'expression de CDK8 pouvait être induite par

l'activation oncogénique de la voie KRAS/MAP Kinase, nous avons utilisé des modèles cellulaires de transformation oncogénique plus simples. En effet, nous avons utilisé les cellules épithéliales intestinales normales de rat d'origine cryptale mais immortalisées (IEC-6), qui ont été transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase : KRAS^{G12V} [Cagnol et Rivard, 2013], BRAF^{V600E}ER [Cagnol et Rivard, 2013] ou la forme hyperactive de MEK1 (MEKca) [Boucher *et al.*, 2004]. Nous avons donc réalisé un immunobuvardage sur ces différentes lignées transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase, afin de déterminer l'expression protéique de CDK8, comparativement aux cellules normales, non transformées, c'est-à-dire exprimant soit le vecteur vide (IEC-6 pBabe), soit le BRAF^{V600E}ER oncogénique non induit par la stimulation au tamoxifène, soit le MEK sauvage (MEKwt). Nous avons également évalué l'impact de l'inhibition de la voie KRAS/MAP Kinase, *via* un traitement avec l'inhibiteur pharmacologique de MEK, le U0126 sur l'expression de CDK8 dans ces cellules transformées. La Figure 12A montre que la protéine CDK8 est surexprimée dans les cellules transformées par le KRAS^{G12V} (environ 4 fois) et le BRAF^{V600E}ER (environ 3.5 fois) induit ainsi que par l'expression du MEKca (environ 2 fois) comparativement aux cellules contrôles. Cependant, cette induction de l'expression protéique de CDK8 est inhibée par le traitement des cellules transformées avec le U0126 à une concentration de 20µM pendant 24 h, un traitement qui bloque la phosphorylation des kinases ERK1/2 (Figure 12A). Finalement, nous avons vérifié le niveau des transcrits de CDK8 par PCR-quantitative dans les cellules transformées ou non par KRAS^{G12V}. Tel qu'illustré à la Figure 12B, le niveau des transcrits de CDK8 semble être augmenté dans les cellules transformées par l'oncogène KRAS par rapport aux cellules contrôles non transformées.

1.4 L'induction de l'expression de CDK8 précède la transformation morphologique des cellules exprimant le BRAF oncogénique inducible

Suite à cette observation d'induction de l'expression de CDK8 dans les cellules transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase, nous avons voulu savoir si cette induction précédait ou non la transformation cellulaire.

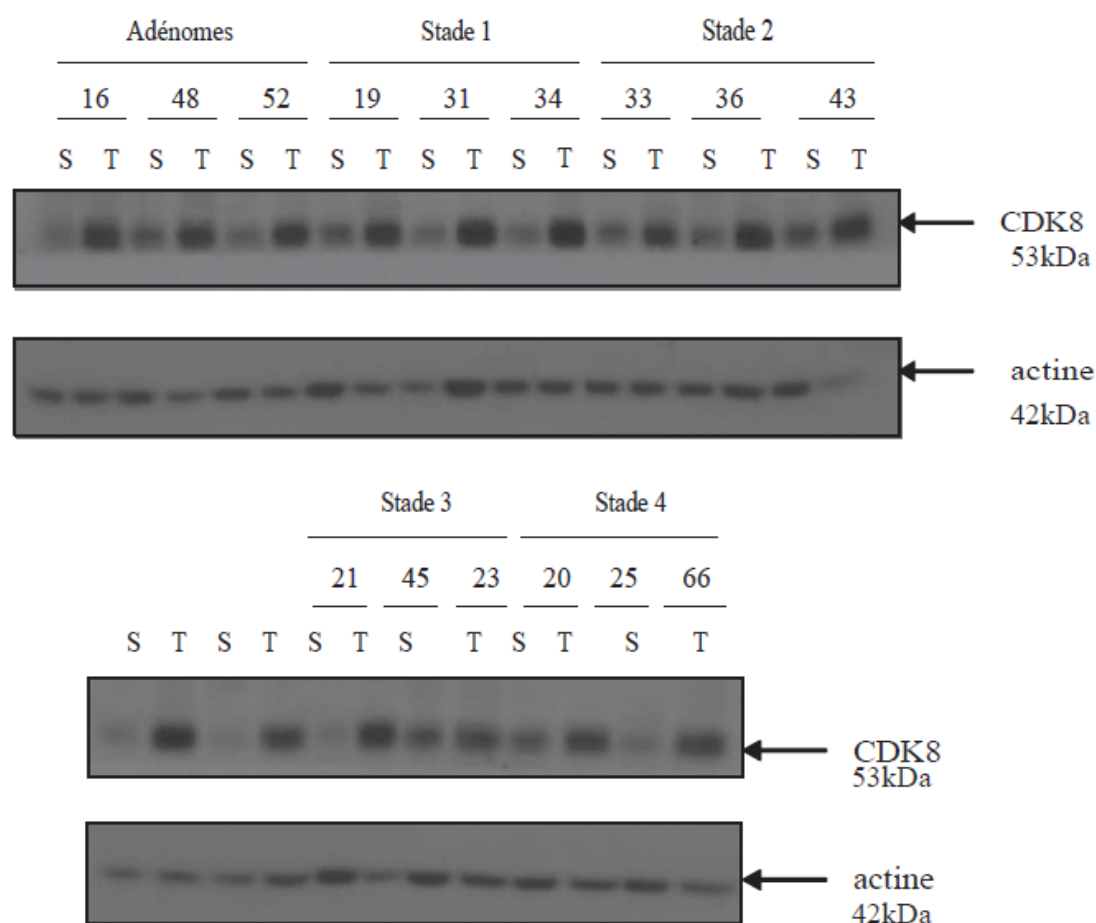


Figure 10: L'expression de CDK8 est augmentée dans des tumeurs colorectales.
L'expression de CDK8 a été analysée par immunobuvardage dans des échantillons de patients atteints de cancer colorectal (T) à différents stades de la carcinogénèse, comparativement à la marge saine du même individu (S). Les différents stades de la carcinogénèse vont de l'adénome, à l'adénocarcinome de stade 4, en passant par les stades 1, 2 et 3. L'expression de la protéine β -actine permet de valider la quantité de protéines déposées sur le gel pour chaque échantillon.

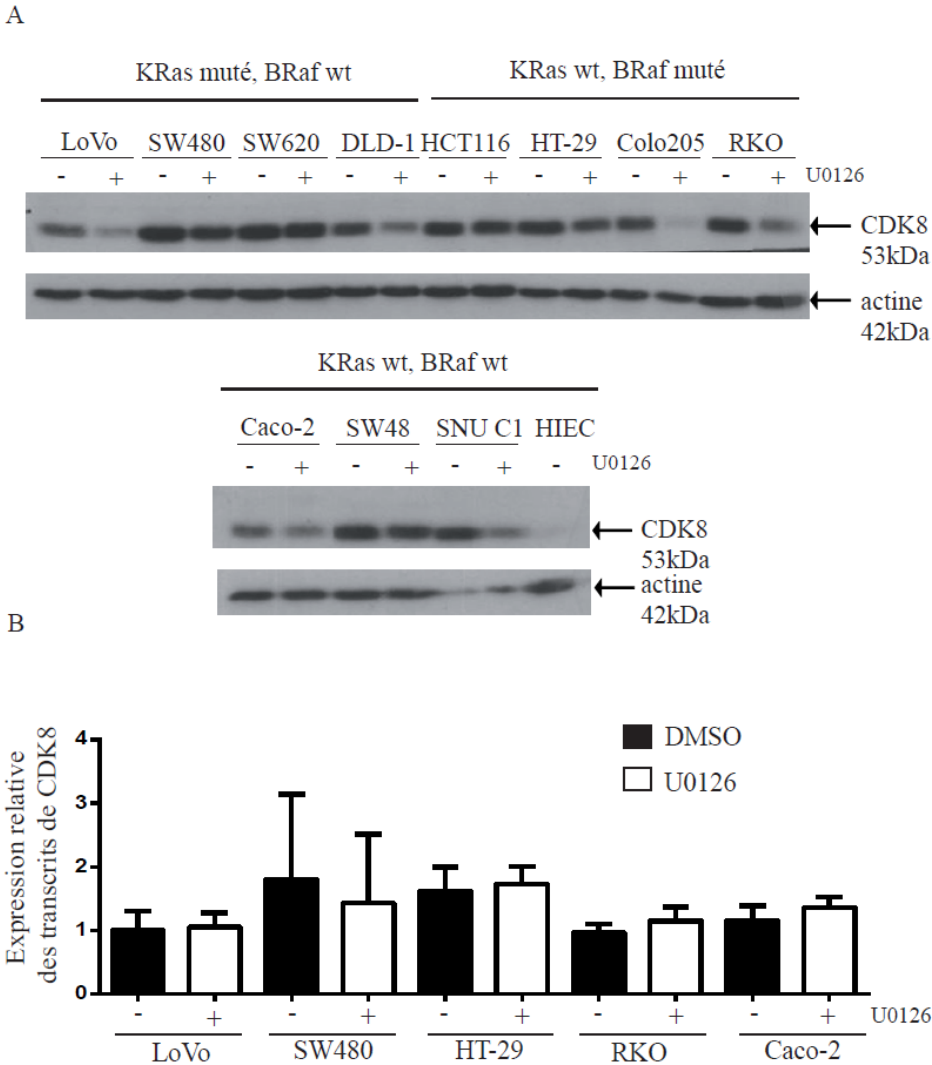


Figure 11: L'expression de CDK8 est augmentée dans des lignées cancéreuses colorectales humaine.

A: Analyse de l'expression protéique de CDK8 dans des lignées cancéreuses colorectales humaines ayant ou non des mutations dans les oncogènes KRAS et BRAF. L'expression de CDK8 dans ces lignées cancéreuses fut comparée avec son expression dans une lignée cellulaire épithéliale intestinale humaine normale, les HIEC. Comparaison également de l'expression de CDK8 dans les lignées cancéreuses colorectales humaines suite à un traitement au U0126, un inhibiteur pharmacologique de MEK à une concentration de 20 μ M pendant 48 heures. L'expression de la β -actine permet de valider la quantité de protéines déposées sur gel. Résultats représentatifs de 3 expériences indépendantes (n=3). **B:** Analyse de l'expression de l'ARNm de CDK8 par PCR quantitative dans les lignées cancéreuses colorectales humaines mutées ou non par les oncogènes KRAS et BRAF, traitées ou non par le U0126 à une concentration de 20 μ M pendant 48 h (n=3), par rapport aux gènes de référence MRPL19, SDHA et YWHAZ.

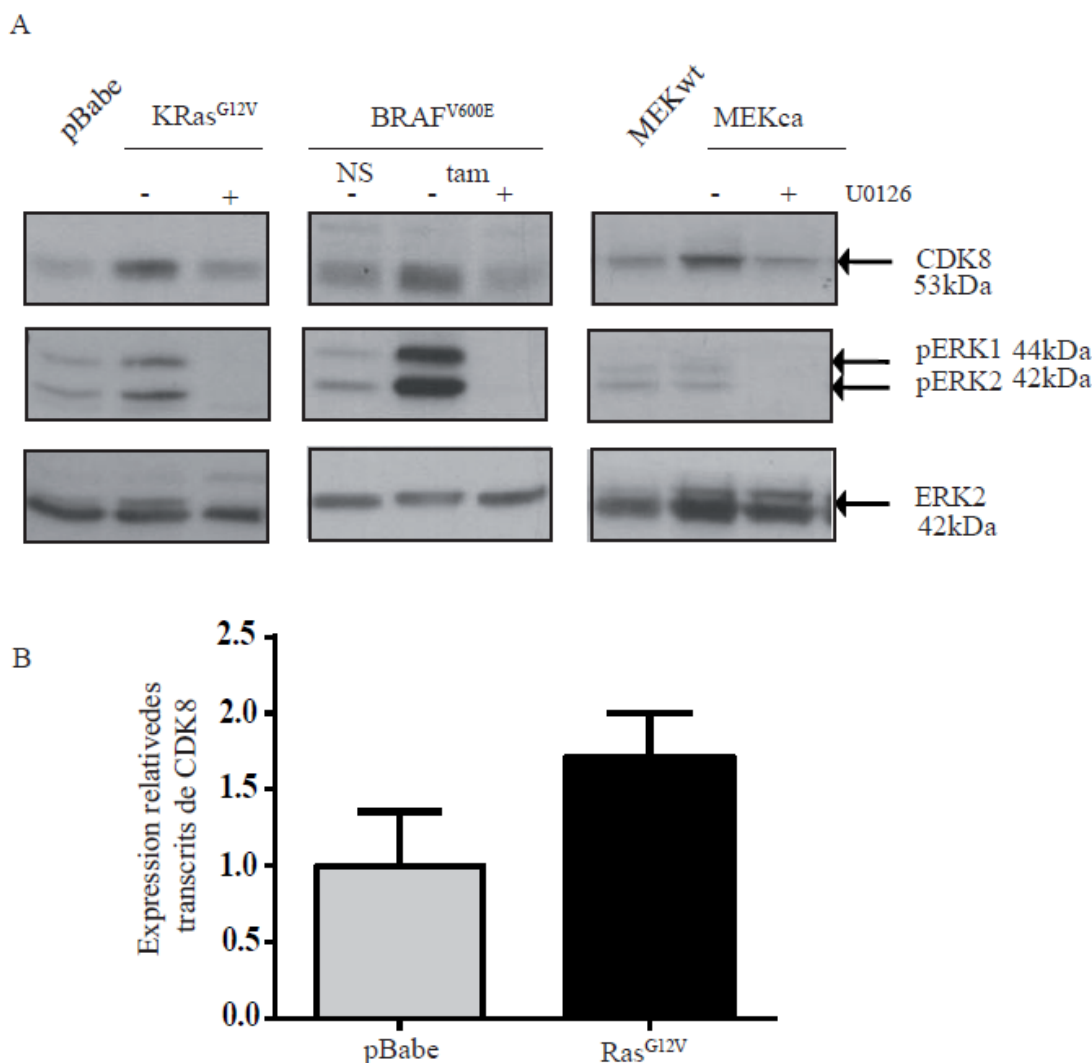


Figure 12: L'expression de CDK8 est augmentée dans les lignées cellulaires IEC-6 transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase.

A: Analyse de l'expression protéique de CDK8 dans les cellules épithéliales intestinales (IEC-6) transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase: KRAS^{G12V}, BRAF^{V600E}ER stimulées au tamoxifène à une concentration de 250 nM pendant 24 h et MEKca, comparativement aux cellules contrôles exprimant soit le vecteur vide (pBabe), soit le BRAF^{V600E}ER non induit, soit le MEK sauvage (MEKwt). De plus, ces lignées transformées ont été également traitées pendant 24 h avec l'inhibiteur pharmacologique de MEK, le U0126 à une concentration de 20 µM. L'analyse de la phosphorylation de ERK1/2 (pERK) permet de valider l'activation de la voie et celle de ERK2 de valider la quantité de protéine déposée. Résultat représentatif de 3 expériences indépendantes (n=3). **B:** Analyse de l'expression en ARNm de *cdk8* dans les cellules IEC-6 transformées par le KRAS^{G12V}. Celles-ci présentent une induction des transcrits de *cdk8*, par rapport aux gènes de références *pum1*, *rpl19* et *tubb5*. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes (n=3).

Pour cela, nous avons utilisé le modèle de cellules IEC-6 transformées par l'expression du BRAF^{V600E}ER inducible. Nous avons réalisé une cinétique de stimulation au tamoxifène de ces cellules pour induire le BRAF oncogénique. Tel qu'attendu, l'ajout de tamoxifène à une concentration de 250nM, augmente rapidement, dès 1 h, le niveau de phosphorylation des ERK1/2 dans ces cellules. De manière parallèle, nous avons aussi observé une induction de l'expression protéique de CDK8 dès 16 h de stimulation au tamoxifène (environ 1.5 fois), induction qui est encore augmentée à 24 h et 36 h (environ 2 fois) puis qui semble se stabiliser (Figure 13A). De manière intéressante, des formes accusant un retard de migration sur gel sont également observées après 1 h de stimulation suggérant que CDK8 puisse être aussi phosphorylée dans ces conditions (Figure 13A, voir flèches). Nous avons également évalué l'expression de CDK8 en ARNm par PCR-quantitative. Nous avons pu constater l'induction de l'ARNm de CDK8 dès 16 h de stimulation au tamoxifène, induction qui continue à augmenter à 24 h puis qui semble se stabiliser (Figure 13B). Ces résultats suggèrent que l'induction de CDK8 a lieu avant la transformation morphologique des cellules exprimant le BRAF^{V600E}ER, transformation qui est observée à partir de 24 h suivant la stimulation au tamoxifène [Cagnol et Rivard, 2013].

2. Analyse de la contribution de CDK8 dans la transformation des cellules épithéliales intestinales induite par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase.

Afin de déterminer la contribution de CDK8 dans la transformation des cellules épithéliales intestinales induite par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase, nous avons généré un shARN dirigé contre CDK8 (voir Matériel et méthodes), ainsi que son contrôle non ciblant (shCtrl). Ces ARN interférents ont été ensuite exprimés de manière stable dans les cellules IEC-6 exprimant le BRAF^{V600E}ER inducible et les cellules IEC-6 exprimant le MEKwt et le MEKca par infection lentivirale. Tel qu'observé à la Figure 14, l'expression d'un shARN dirigé contre CDK8 réduit spécifiquement d'environ 50% l'expression de cette protéine dans nos modèles cellulaires.

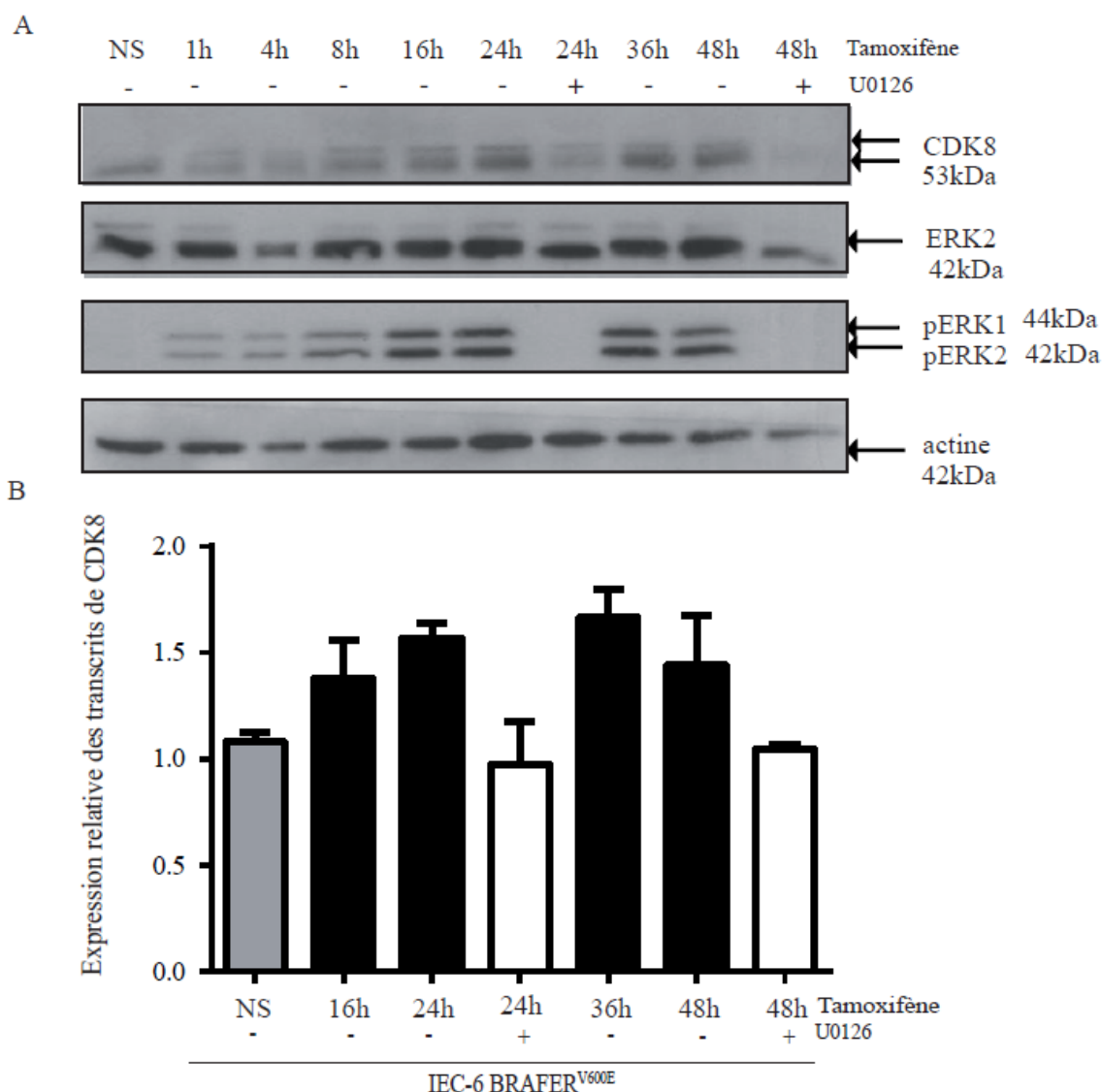


Figure 13: Expression de CDK8 dans les cellules IEC-6 BRAFV600EER suivant une stimulation au tamoxifène, au cours du temps.

A: L'expression de CDK8 a été analysée dans les cellules IEC-6 BRAFV600EER suite à l'activation de l'oncogène par une stimulation au tamoxifène (250 nM), au cours du temps. Pour certain temps de stimulation, le U0126 (20 µM) a été ajouté aux cellules en même temps que le tamoxifène. A: Analyse de l'expression protéique de CDK8, des formes phosphorylées de ERK1/2 (pERK), de ERK2 et de la β-actine par immunobuvardage dans les cellules IEC-6 BRAF-ER à différents temps de stimulation au tamoxifène. L'expression de ERK2 et de la β-actine valide la quantité de protéines déposées sur le gel. Résultat représentatif de 3 expériences indépendantes (n=3). B: Analyse de l'expression des transcrits de *cdk8* par PCR-quantitative dans les cellules IEC-6 exprimant le BRAF oncogénique, selon les gènes de référence *pum1*, *rpl19* et *tubb5*. Les cellules traitées au tamoxifène pendant 24 h présentent une induction du transcrit de *cdk8* et ce, en comparaison aux cellules non stimulées (NS); de plus les cellules ayant subi un traitement au U0126 pendant 24 h présentent une diminution de cette induction et ce, en comparaison avec les cellules traitées 24 h au tamoxifène. Résultats combinés de 3 expériences indépendante (n=3).

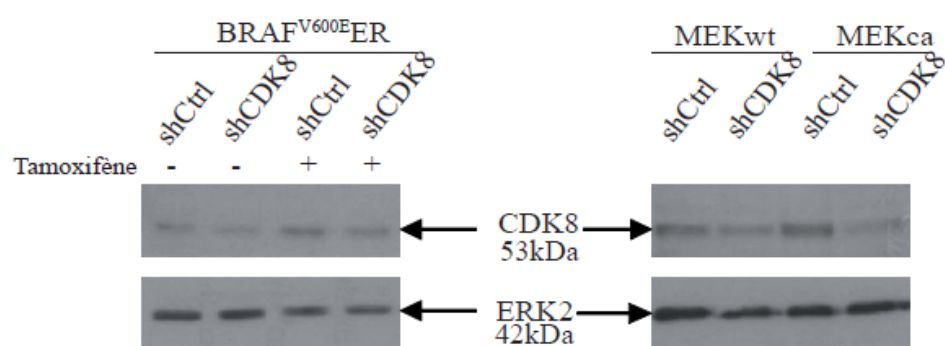


Figure 14: Validation de l'inhibition de l'expression de CDK8 via un shARN dans les lignées IEC-6 exprimant le BRAF^{V600E}ER oncogénique et les formes sauvage ou active de MEK1.

Les cellules IEC-6 BRAF^{V600E}ER, les cellules IEC-6 MEKwt et les cellules IEC-6 MEKca expriment de façon stable suite à une infection lentivirale soit un shARN dirigé contre CDK8 soit un shARN non ciblant (shctrl). L'effet de ce shARN sur l'expression de CDK8 dans ces différentes lignées a été validé par immunobuvardage. L'expression de la β -actine permet de valider la quantité de protéines déposées sur gel.

2.1 Impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur la prolifération des cellules transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase.

Nous avons analysé l'impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur la prolifération des cellules transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase. Pour cela, nous avons utilisé les cellules IEC-6 exprimant soit le BRAF^{V600E}ER oncogénique inductible dans lequel nous avons ou non inhibé l'expression de CDK8 *via* le shARN. Nous avons aussi utilisé les cellules IEC-6 exprimant soit le MEKwt soit le MEKca dans lesquelles nous avons également inhibé l'expression de CDK8 *via* le shARN. La prolifération a été par la suite analysée dans ces différentes populations cellulaires soit par la mesure de l'incorporation de BrdU ou par un décompte cellulaire.

2.1.1 Incorporation de BrdU dans les cellules IEC-6 BRAF^{V600E}ER inductible.

Suite à l'expression de manière stable du shARN dirigé contre CDK8 et du shCtrl non ciblant dans les cellules IEC-6 BRAF^{V600E}ER par infection lentivirale, nous avons procédé à un essai d'incorporation du BrdU dans ces cellules en phase exponentielle de croissance. Le BrdU est un agent chimique analogue à la thymidine qui s'incorpore à l'ADN, lors de sa réplication (phase S). La quantification de l'incorporation de BrdU dans les cellules IEC-BRAF^{V600E}ER permettra d'évaluer l'impact de l'inhibition de CDK8 sur l'entrée en phase S du cycle cellulaire de ces cellules. Nous avons d'abord réalisé ce test d'incorporation de BrdU sur les cellules non stimulées au tamoxifène donc considérées comme normales et sur des cellules stimulées au tamoxifène pendant 16 h à une concentration de 50nM. Tel que montré à la Figure 15, l'inhibition de l'expression de CDK8 n'a pas eu d'effet notable sur l'incorporation de BrdU dans les cellules non stimulées au tamoxifène. Par contre, seulement 30% des cellules traitées au tamoxifène, déficientes dans l'expression de CDK8 ont incorporé du BrdU, comparativement aux cellules contrôles (45%). Ceci semble suggérer que CDK8 joue un rôle dans la prolifération des cellules exprimant l'oncogène BRAF.

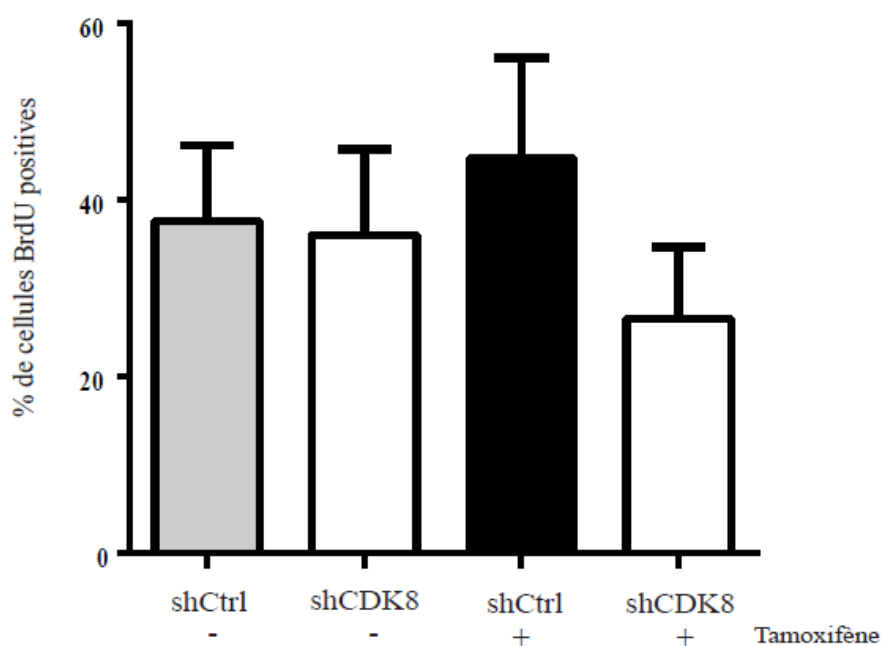


Figure 15: Impact de l'inhibition de CDK8 sur l'entrée en phase S des cellules transformées par le BRAF^{V600E}ER inducible.

Les différentes populations cellulaires ont étéensemencées sur lamelle, stimulées ou non au tamoxifène (50 nM, 16 h) et incubées 2 h avec 1% de BrdU. Les cellules ont par la suite été fixées et une immunofluorescence a été réalisée avec une anticorps anti-BrdU. Le décompte cellulaire s'est fait via le logiciel ImageJ, les valeurs en pourcentage sont estimées sur un décompte d'environ 1000 cellules. Les cellules IEC-6 BRAF^{V600E}ER shCDK8 positives au BrdU sont moins nombreuses que les cellules IEC-6 BRAF^{V600E}ER shCtrl. Le graphique représente 2 expériences indépendantes (n=2).

2.1.2 Décompte cellulaire et établissement d'une courbe de prolifération

Suite à l'expression de manière stable du shARN dirigé contre CDK8 et du shCtrl non ciblant dans les cellules IEC-6 MEKwt et IEC-6 MEKca par infection lentivirale, nous avons procédé à un décompte cellulaire afin d'établir une courbe de prolifération. Nous avons réalisé ce décompte cellulaire pendant 11 jours soit jusqu'à l'atteinte de la confluence par les cellules. Nous avons constaté que l'inhibition de CDK8 dans les cellules IEC-6 MEKwt affecte globalement peu leur prolifération après 11 jours (Figure 16A). Par contre, la perte d'expression de CDK8 dans les cellules IEC-6 transformées par l'expression du MEKca entraîne un ralentissement notable de leur prolifération (Figure 16B) suggérant que CDK8 est impliquée dans la prolifération des cellules transformées.

2.2 Impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur le potentiel des cellules transformées à croître en indépendance d'ancrage.

Les cellules transformées par l'expression du MEKca ont la capacité de croître en indépendance d'ancrage [Lemieux *et al.*, 2009]. Un test de croissance en agarose mou a donc été réalisé dans les cellules IEC-6 transformées par le MEKca et sous-exprimant ou non CDK8. La Figure 17 montre que l'inhibition d'expression de CDK8 bloque presque totalement la capacité des cellules transformées par la forme hyperactive de MEK à croître en agarose mou. Ce résultat suggère fortement que CDK8 contrôle le potentiel de croissance en indépendance d'ancrage des cellules transformées par l'expression du MEKca.

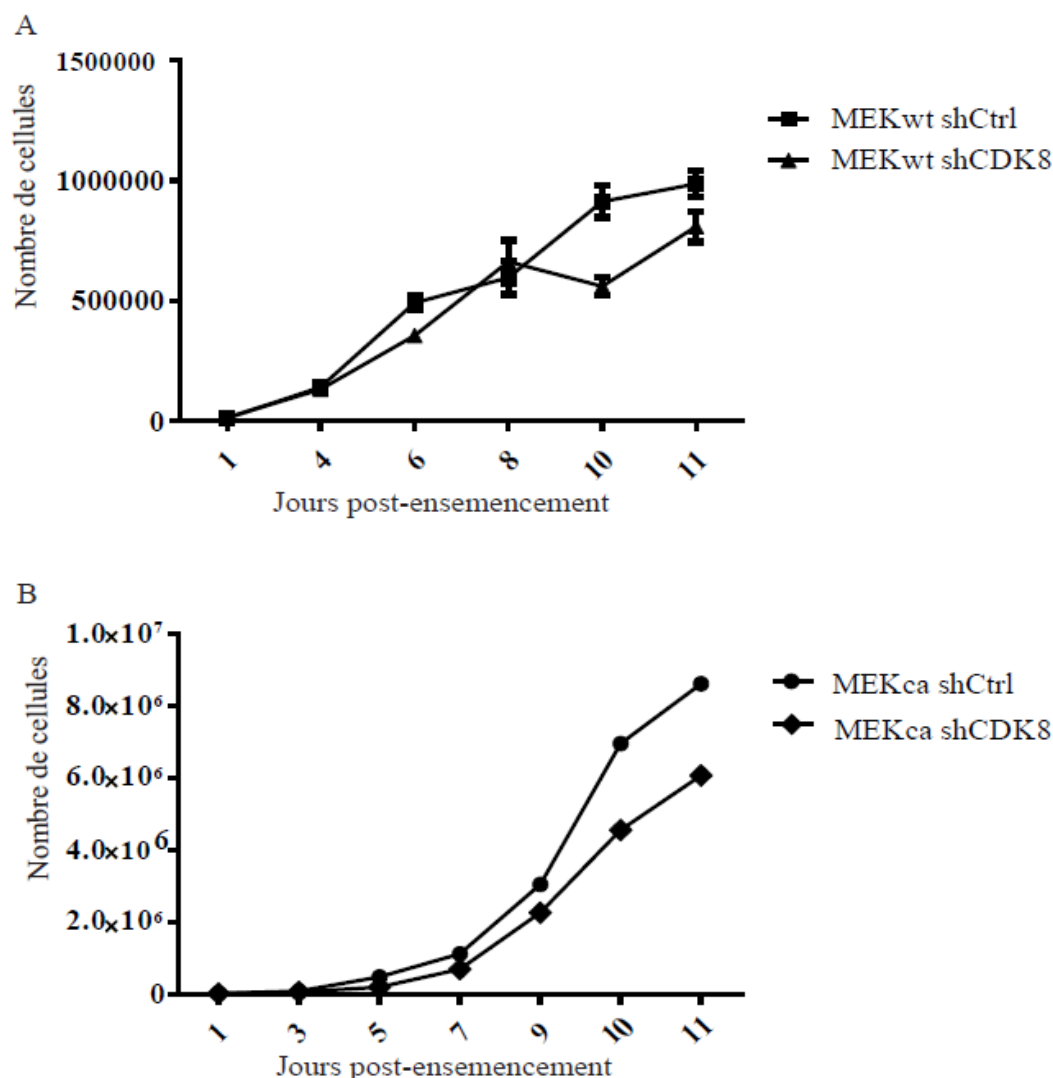


Figure 16: Impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur la prolifération des cellules transformées par l'hyperactivation de MEK.

Les cellules IEC-6 MEKwt ou IEC-6 MEKca dans lesquelles nous avons ou non inhibé l'expression de CDK8 *via* le shARN ont été dénombrées *via* un hémacimètre à différents jours suivant l'ensemencement et ce, jusqu'à l'atteinte de la confluence. **A** : Courbe de prolifération des cellules IEC-6 MEKwt dans lesquelles nous avons inhibé ou non l'expression de CDK8 *via* le shARN. À 6 jours post-ensemencement, la prolifération des cellules présentant le shCDK8 est significativement plus lente ($p=0.0273$ (*)), ainsi qu'à 10 jours ($p=0.0099$ (**)) suivant un T-test non païré. Résultats représentatifs de 2 expériences indépendantes ($n=2$) **B** : Courbe de prolifération des cellules IEC-6 MEKca dans lesquelles nous avons ou non inhibé l'expression de CDK8 *via* le shARN. , ainsi qu'à 10 jours ($p=0.0095$ (##)) et à 11 jours ($p=0.0161$ (#)) suivant un T-test non païré. Résultats représentatifs de 2 expériences indépendantes ($n=2$).

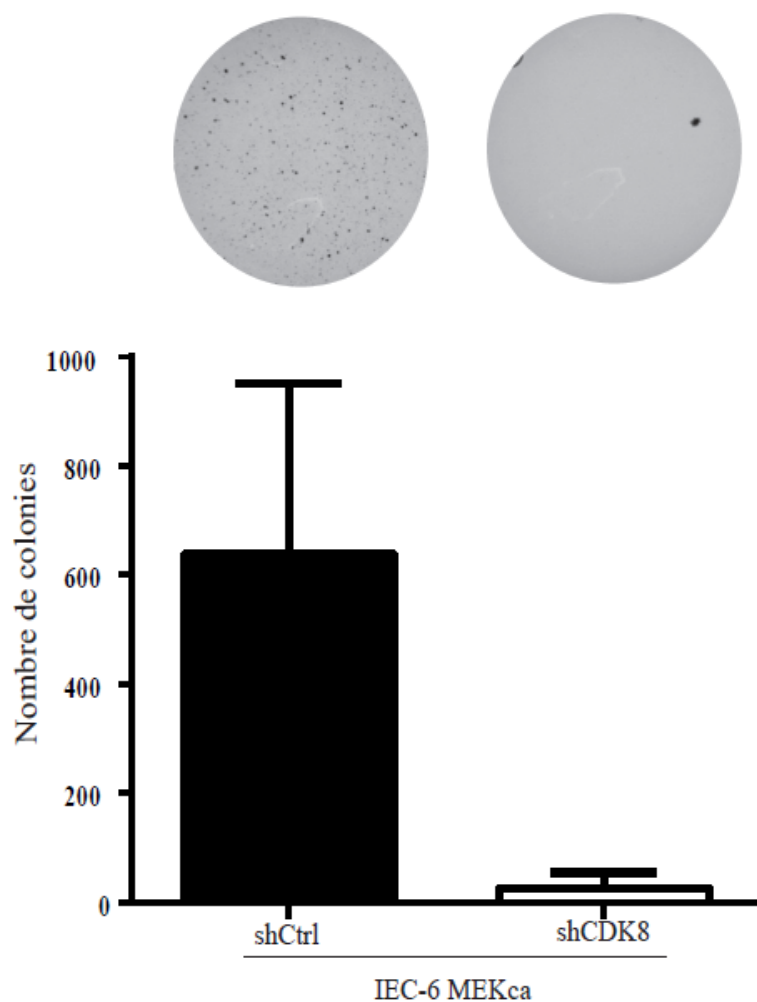


Figure 17: Impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur la croissance en indépendance d'ancrage des cellules IEC-6 transformées par une forme hyperactive de MEK.

Les cellules ont étéensemencées dans une suspension composée d'agarose afin de mimer l'indépendance d'ancrage. Après quelques semaines, les agaroses ont été colorés avec du MTT à une concentration de 0.5mg/ml pendant 3 h afin de colorer les colonies de cellules vivantes. Puis, les pétris ont été pris en photos et le nombre de colonies vivantes ont été dénombrées grâce au logiciel d'analyse d'images ImageJ. Les cellules IEC-6 MEKca dont l'expression de cdk8 est inhibée présentent une diminution du nombre de colonies. Ce résultat représente deux expériences indépendantes (n=2).

2.3 Impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur la morphologie des cellules transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase.

Les cellules épithéliales intestinales normales ont un phénotype cuboïdale résultant principalement des fortes interactions cellule-cellule établies par les jonctions serrées et adhérentes. Suite à l'expression des oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase, ces cellules subissent une transformation morphologique [Cagnol et Rivard, 2013; Lemieux *et al.*, 2009]. En effet, ces cellules perdent leurs contacts cellule-cellule et deviennent plus étirées adoptant un phénotype fibroblastique. Par exemple, lorsque les cellules exprimant le BRAF^{V600E}ER oncogénique inductible ne sont pas stimulées au tamoxifène, elles ont un phénotype épithélial normal. Mais lorsqu'elles sont stimulées avec le tamoxifène, elles changent rapidement leur morphologie et deviennent plus fibroblastiques et moins adhérentes [Cagnol et Rivard, 2013]. De manière intéressante, lorsque l'expression de CDK8 est inhibée, la transformation morphologique des cellules IEC-6 BRAF^{V600E}ER semble fortement atténuée. En effet, certaines cellules ont conservé leur phénotype épithélial et leur adhérence à la matrice (étalement cellulaire) telle que visualisé par microscopie en contraste de phase (Figure 18A, voir flèches). En accord avec ces observations, l'inhibition d'expression de CDK8 dans les cellules exprimant le MEKca atténue également leur phénotype fibroblastique. Ces cellules adoptent d'ailleurs un phénotype plus épithélial (Figure 18B, voir flèches). Pris ensemble, ces résultats suggèrent fortement que CDK8 joue un rôle dans la transformation morphologique des cellules exprimant les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase. Afin de mieux comprendre ce changement morphologique, nous avons réalisé des immunofluorescences indirectes dirigées contre l'actine filamenteuse et la paxilline une protéine qui se trouve localisée aux points d'adhésion, dans les cellules IEC-6 MEKca déficientes ou non pour l'expression de CDK8. Des travaux précédents dans notre laboratoire ont déjà rapporté que les cellules exprimant le mutant hyperactif de MEK présentent un cytosquelette d'actine filamenteuse complètement désorganisé, avec une perte d'actine corticale associée à la perte des contacts cellule-cellule [Lemieux *et al.*, 2009]. Nous avons pu, en effet, constater cette désorganisation de l'actine filamenteuse qui est en plus, accompagnée d'une délocalisation de la paxilline dans les cellules IEC-6 exprimant le MEKca (Figure 19). Cependant,

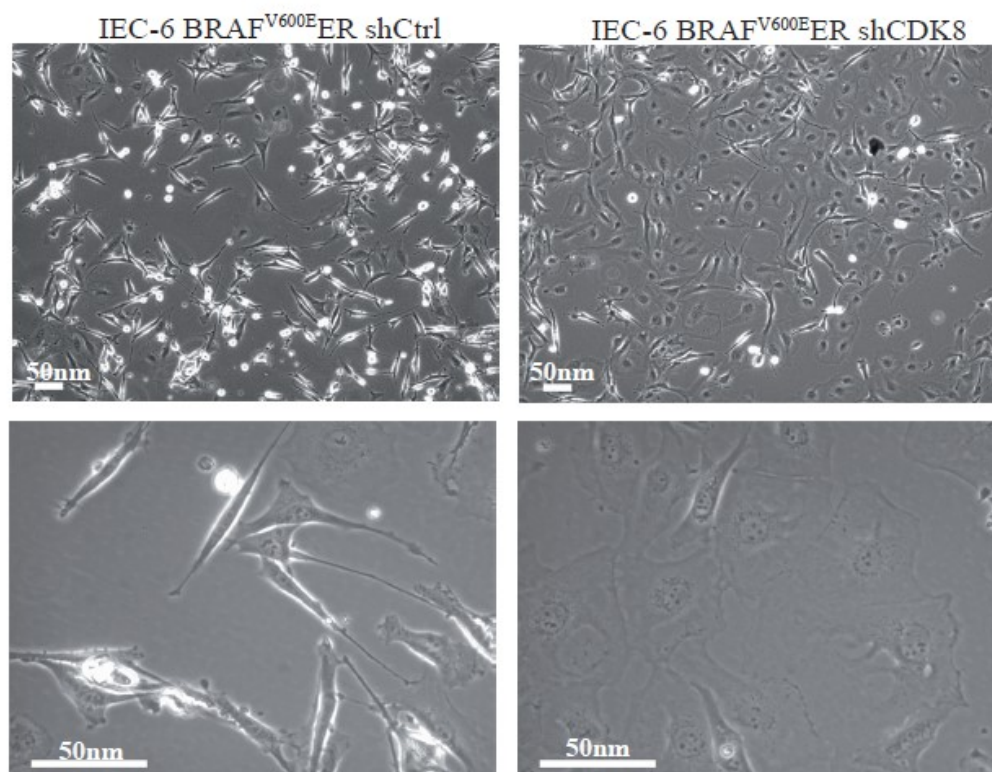
l'inhibition d'expression de CDK8 restaure partiellement l'actine filamenteuse au pourtour des cellules qui sont plus épithéliales de même que restaure la localisation de la paxilline aux points focaux d'adhésion (Figure 19).

3. Rôle de CDK8 dans la transformation morphologique induite par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase.

3.1 Implication de CDK8 dans l'expression des gènes associés à l'EMT.

Ce retour partiel à une morphologie plus épithéliale des cellules transformées lorsque l'expression de CDK8 est inhibée pourrait suggérer un renversement de l'EMT induite par l'hyperactivation de MEK [Lemieux *et al.*, 2009]. Nous avons donc analysé l'expression protéique de la E-cadhérine, une protéine des jonctions adhérentes, qui figure comme l'un des principaux marqueurs de l'EMT [Guarino *et al.*, 2007; Peinado *et al.*, 2004]. D'ailleurs, notre groupe a déjà rapporté que l'expression du mutant constitutif de MEK1 dans les cellules IEC-6 diminuait fortement l'expression de la E-cadhérine [Lemieux *et al.*, 2009]. Cette baisse d'expression de la E-cadhérine était attribuable à la hausse importante d'expression de Snail1 et Snail2 [Lemieux *et al.*, 2009], deux répresseurs transcriptionnels bien connus du gène codant pour la E-cadhérine [Peinado *et al.*, 2004]. De manière intéressante, l'inhibition d'expression de CDK8 dans les cellules transformées par l'hyperactivation de MEK présente une augmentation de 2.3 fois de l'expression protéique de la E-cadhérine (Figure 20A). Cette hausse d'expression de la E-cadhérine pourrait être attribuable à la baisse d'expression de Snail1 et de Snail2 observée dans les cellules déficientes pour CDK8 (Figure 20B). Des expériences sont en cours afin de confirmer cette tendance.

A



B

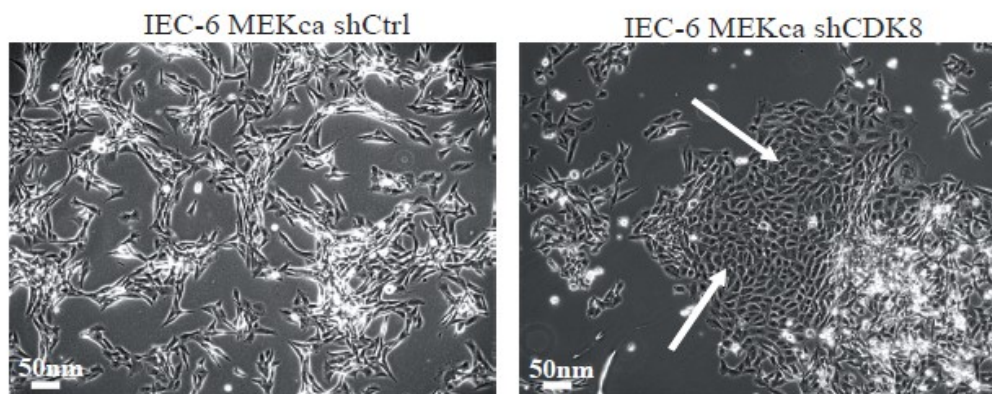


Figure 18 : Impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur la morphologie des cellules transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase.

Suite à l'inhibition de l'expression de CDK8 via shARN dans les lignées IEC-6 BRAF^{V600E}ER et IEC-6 MEKca ainsi que leurs contrôles, la morphologie cellulaire a été observée par microscopie en contraste de phase à différents grossissements. **A** : Photos en contraste de phase (deux grossissements différents 10X et 40X) des cellules IEC-6 BRAF^{V600E}ER déficientes ou non pour l'expression de CDK8 et stimulées au tamoxifène à une concentration de 50 nM pendant 48 h. **B** : Photos représentatives en contraste de phase (grossissement 10X) des cellules IEC-6 MEKca déficientes ou non pour l'expression de CDK8.

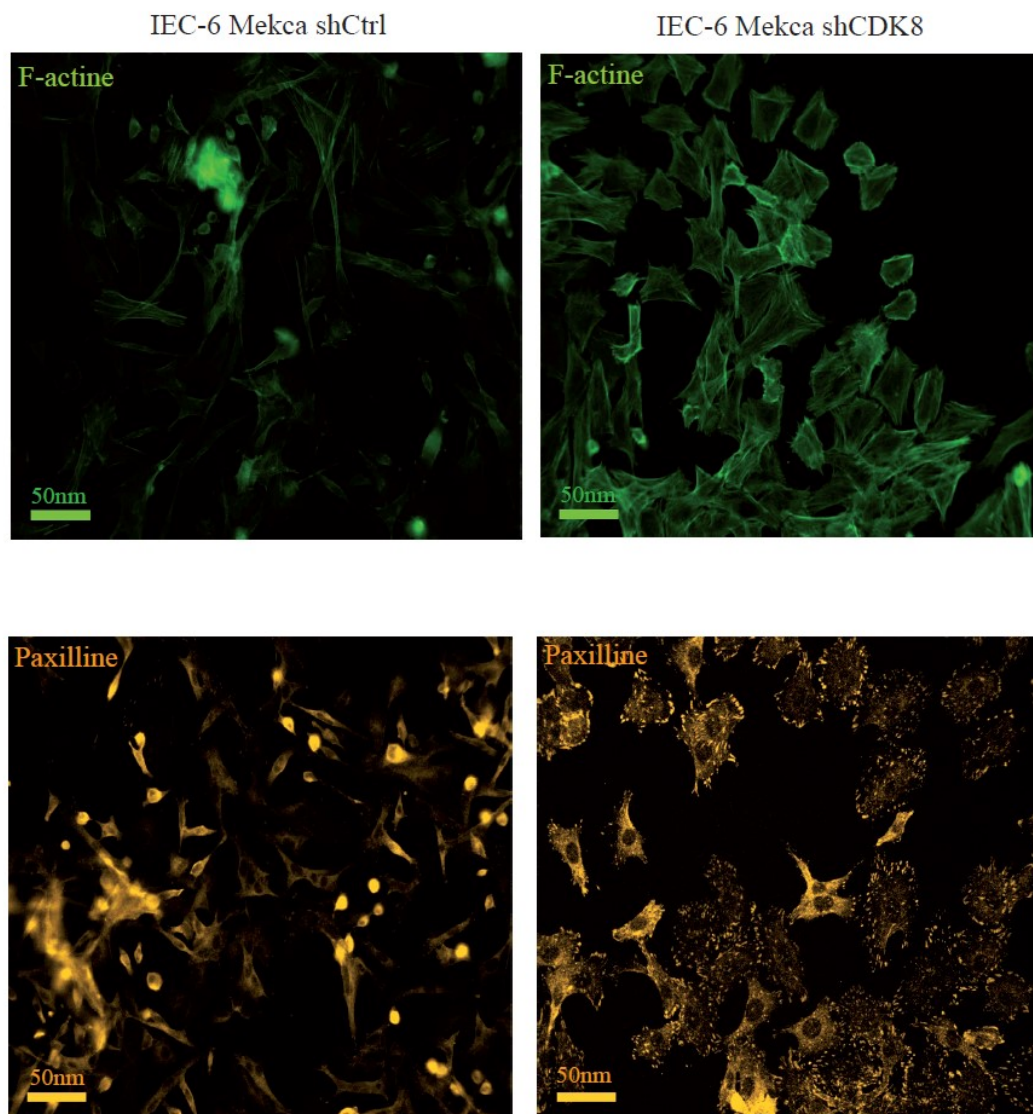


Figure 19: Rôle de CDK8 dans la transformation morphologique des cellules exprimant le mutant constitutif actif de MEK.

Les cellules MEKca déficientes ou non pour l'expression de CDK8 ont étéensemencées sur lamelles puis fixées pour l'analyse par immunofluorescence indirecte de l'actine filamenteuse (phalloïdine) et de la paxilline. L'actine filamenteuse est représentée en vert et la protéine paxilline en orange. Photos représentatives des immunofluorescences prises à un grossissement 20X.

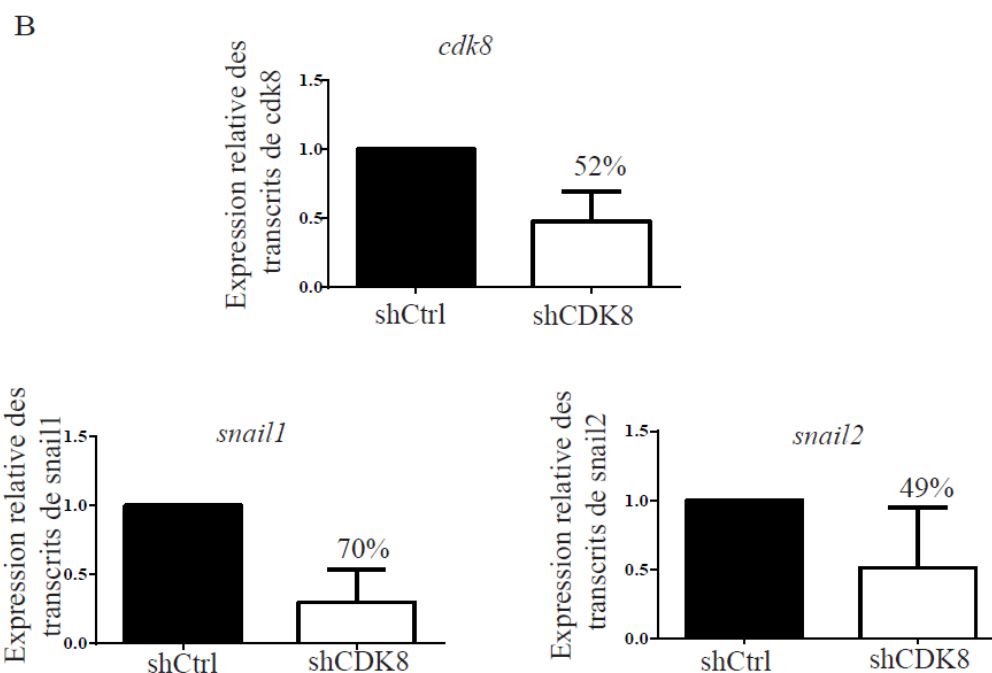
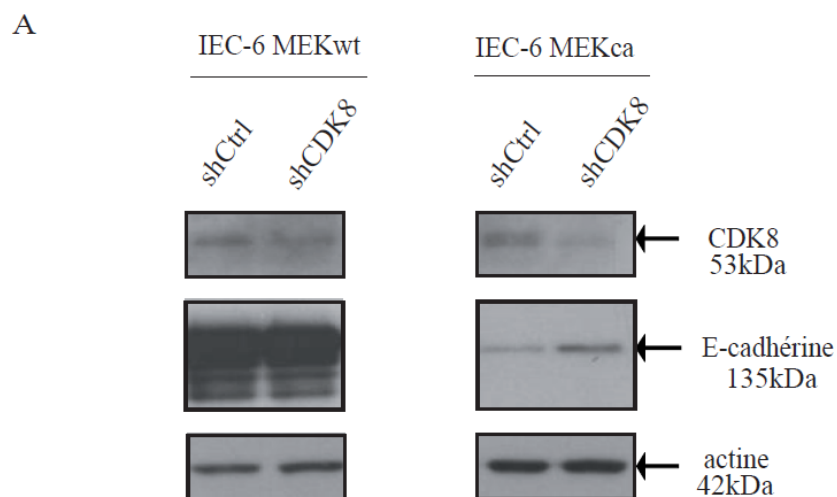


Figure 20 : Impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur les protéines ou gènes lié à l'EMT.

Évaluation de l'impact de l'inhibition de CDK8 sur l'expression de la E-cadhérine et des facteurs de transcription Snail1 et Snail2. **A** : Analyse par immunobuvardage de la E-cadhérine, de CDK8 (pour valider l'effet du shARN) et de la β -actine (pour valider la quantité de protéines déposées sur gel). **B** : Expression des transcrits des facteurs de transcription Snail1 et Snail2 en PCR-quantitative dans les cellules IEC-6 MEKca déficientes ou non pour l'expression de CDK8. Le niveau des transcrits de *cdk8* a aussi été évalué pour confirmer l'effet du shARN utilisé. L'évaluation des niveaux de transcrits se fait par rapport aux gènes de référence *pum1*, *rpl19* et *tubb5*. Résultats représentatifs de 2 expériences indépendantes (n=3).

3.2 Implication de CDK8 dans l'expression de Gem

Gem est une petite protéine G appartenant à la superfamille des Ras GTPases [Maguire *et al.*, 1994] connue pour régulariser l'organisation du cytosquelette d'actine [Piddini *et al.*, 2001]. De plus, le gène codant pour Gem a été récemment identifié comme un gène cible de CDK8 [Donner *et al.*, 2010]. Vu les changements morphologiques observés suite à la baisse d'expression de CDK8, nous avons analysé l'expression de Gem en parallèle avec celle de CDK8 dans les cellules IEC-6 BRAF^{V600E}ER stimulées ou non au tamoxifène. Dans un premier temps, nous avons observé que l'expression de Gem, tout comme celle de CDK8, est significativement augmentée suite à l'activation oncogénique de BRAF et que cette induction est clairement MEK-dépendante puisque bloquée par le U0126 (Figure 21). Afin de vérifier si cette augmentation de l'expression de Gem était bien attribuable à CDK8, nous avons démarré l'analyse du niveau des transcrits de Gem dans les cellules exprimant ou non le shARN dirigé contre CDK8. Des résultats préliminaires présentés en annexe suggèrent que l'expression de Gem induite par l'activation oncogénique de BRAF est complètement inhibée dans les cellules déficientes pour l'expression de CDK8. D'autres expériences qui sont en cours sont évidemment nécessaires pour confirmer ce résultat suggérant que Gem pourrait être impliquée dans la transformation morphologique des cellules exprimant l'oncogène BRAF.

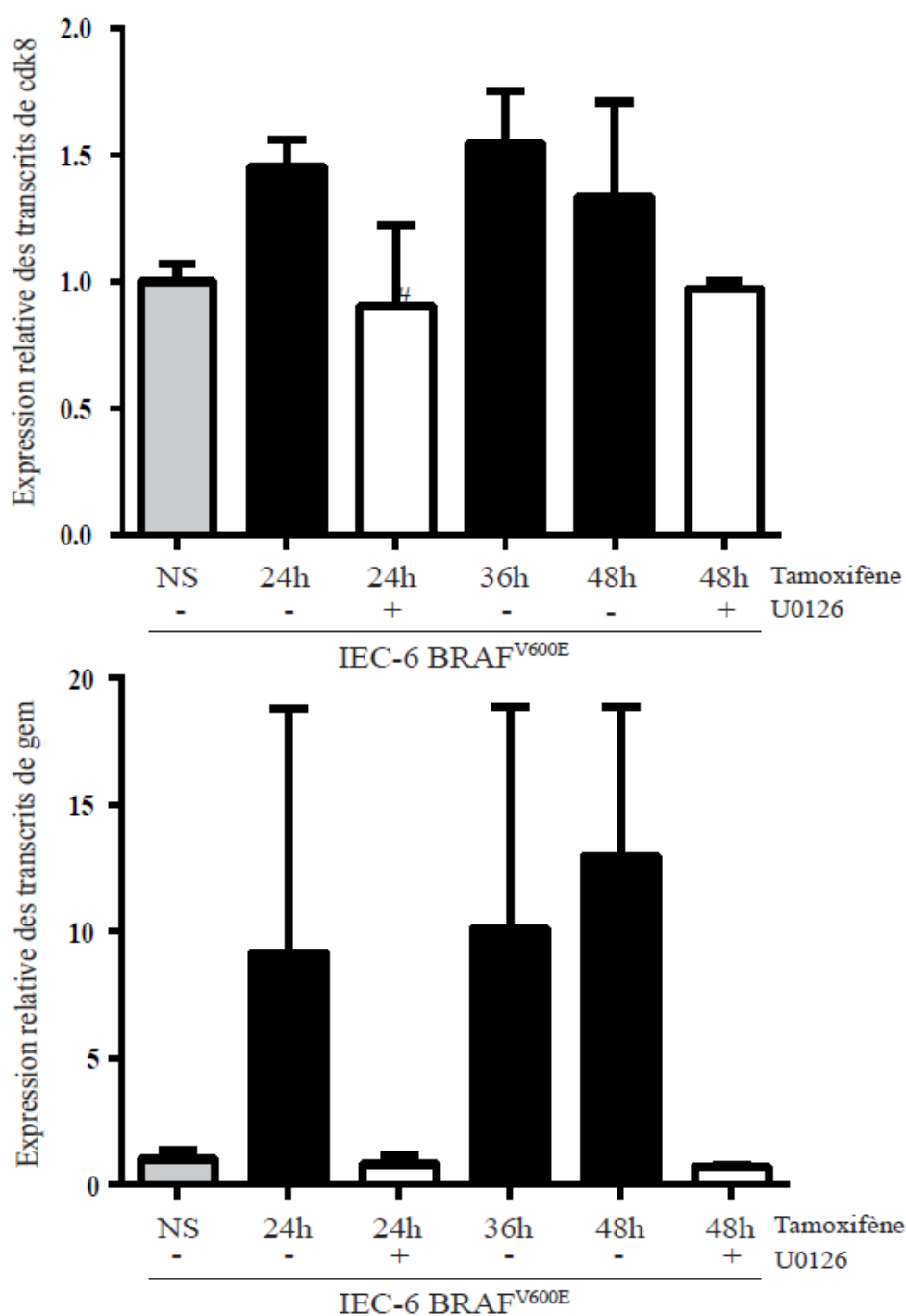


Figure 21: Analyse de l'expression de gem suite à l'induction du BRAF oncogénique.

Les cellules IEC-6 BRAF^{V600E} ont été stimulées au tamoxifène (250 nM) pendant 24 h, 36 h ou 48 h, en présence ou non de 20 μ M de U0126. Par la suite, les cellules ont été lysées et l'ARN a été isolé pour l'analyse par PCR-quantitative des transcrits de gem et de cdk8, selon les gènes de référence *pum1*, *rpl19* et *tubb5*. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes (n=3).

DISCUSSION

Lors de cette étude, nous avons voulu comprendre comment la protéine CDK8 contribuait au potentiel tumorigénique de la voie KRAS/MAP Kinase dans les cellules épithéliales intestinales.

La kinase CDK8 est connue pour jouer un rôle important dans la machinerie transcriptionnelle. En effet, elle peut réguler celle-ci de manière négative : 1) de façon kinase indépendante, par encombrement stérique, en se liant avec le complexe Médiateur [Xu et Ji, 2001]; 2) par phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II [Furumoto *et al.*, 2007]; 3) par phosphorylation de la cycline H, une sous-unité du facteur de transcription TFIIH, empêchant ainsi la formation du complexe de pré-initiation de la transcription [Galbraith *et al.*, 2010]; et finalement, 4) en recrutant des histones méthyltransférases qui vont inhiber l'expression de certains gènes [Knuesel *et al.*, 2009; Donner *et al.*, 2010]. Plus récemment, CDK8 a également été identifiée comme un régulateur positif de la transcription de différents gènes: 1) les gènes cibles du complexe transcriptionnel β -caténine/TCF [Firestein *et al.*, 2008]; 2) les gènes de réponse précoces (IEGs) en réponse à une stimulation au sérum [Donner *et al.*, 2010]; 3) les gènes cibles de réponse à l'hypoxie, induits par le facteur de transcription HIF1 α [Galbraith *et al.*, 2013]. De manière intéressante, ces réponses transcriptionnelles sont impliquées dans plusieurs aspects de l'oncogenèse. En effet, il a été démontré qu'une activation aberrante de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine était retrouvée dans la majorité des cancers colorectaux, contribuant à l'hyperprolifération, à l'invasion tumorale et à la survie cellulaire [Bienz et Clevers, 2000]. Il a également été démontré que la surexpression du facteur de transcription HIF1 α était impliqué dans la progression de nombreux cancers, notamment le cancer colorectal, en entraînant l'augmentation de facteurs angiogéniques, des transporteurs de glucose, des enzymes glycolytiques et des facteurs de survie et d'invasion [Semenza *et al.*, 2012].

Afin de répondre à notre hypothèse qui était que CDK8 est nécessaire au potentiel oncogénique de la voie KRAS/MAP Kinase, une voie potentiellement hyperactivée dans plusieurs cancers colorectaux suite à des mutations de type gain-de-fonction dans les oncogènes *KRAS* ou *BRAF*, nous avons d'abord vérifié l'expression en ARNm et protéique de CDK8 dans différents modèles de cancer colorectal, ainsi que dans des modèles de transformation oncogénique plus simples par la voie KRAS/MAP Kinase. Puis, à l'aide de l'interférence à l'ARN, nous avons analysé la contribution de CDK8 dans la transformation des cellules épithéliales intestinales induite par la voie KRAS/MAP Kinase.

1. Expression de CDK8 et néoplasie colorectale

1.1 Surexpression de CDK8 dans les cellules et tumeurs cancéreuses colorectales humaines

Afin de mieux comprendre le rôle de CDK8 dans le cancer colorectal, nous avons, dans un premier temps, vérifié son expression dans plusieurs tumeurs colorectales humaines à différents stades. De manière intéressante, nous avons observé que CDK8 était surexprimée dans toutes les tumeurs analysées en comparaison avec la marge saine. Nous avons pu constater que cette surexpression était présente à tous les stades de la carcinogénèse: de l'adénome à l'adénocarcinome de stade 4, en passant par les stades 1, 2 et 3. Même si nos résultats représentent un petit échantillonnage de patients atteints de cancer colorectal, ceux-ci concordent avec les données de la littérature. En effet, d'autres études réalisées sur des échantillons de tumeurs colorectales effectuées sur de plus grosses cohortes de patients ont montré qu'il y avait surexpression de la protéine CDK8 [Seo *et al.*, 2010], ainsi qu'un gain de copie du gène *CDK8* [Firestein *et al.*, 2008] dans la majorité des tumeurs colorectales. L'expression de la protéine CDK8 dans les tumeurs dès le stade d'adénome suggère que celle-ci pourrait être impliquée de façon précoce dans l'initiation de la carcinogénèse colorectale. En effet, il a été montré que la protéine CDK8 était notamment impliquée dans la régulation de la transcription des gènes cibles de la voie

Wnt/ β -caténine [Firestein *et al.*, 2008], une voie très fréquemment dérégulée dans les premiers stades de la carcinogénèse colorectale due aux mutations précoces survenant dans le gène *APC* [Pinto *et al.*, 2003, Kunhert *et al.*, 2004]. Le gène *APC* est un gène suppresseur de tumeur et son altération est considérée comme initiatrice d'une vaste majorité de cancers colorectaux [Moran *et al.*, 2010]. Mais la surexpression de CDK8 dans les différents stades d'adénocarcinomes suggèrent également qu'elle pourrait être aussi impliquée dans la progression de la carcinogénèse colorectale [Seo *et al.*, 2010]. La surexpression de CDK8 dans le cancer colorectal a été associée à l'amplification du gène *CDK8* localisé sur le bras long du chromosome 13, une région fréquemment amplifiée dans le cancer colorectal. L'amplification de cette région chromosomique englobe 16 gènes entraînant un gain du nombre de leurs copies. Quatre de ces gènes ne sont pas exprimés dans le cancer colorectal, et parmi les 12 gènes exprimés, seul *CDK8* est requis pour permettre la prolifération des cellules présentant cette amplification [Firestein *et al.*, 2008].

Nous avons aussi comparé l'expression de la protéine CDK8 dans des cellules épithéliales intestinales normales, les HIEC et dans des cellules cancéreuses colorectales humaines établies et présentant différents types d'altérations génétiques. Nous avons constaté que l'expression de la protéine CDK8 dans les cellules HIEC était extrêmement faible, alors que les lignées cancéreuses colorectales, sans surprise, présentaient toutes une surexpression de CDK8. Des études récentes ont suggéré que CDK8 pourrait agir comme un oncogène dans les cellules épithéliales intestinales. Premièrement, tel que mentionné ci-haut et démontré par nos résultats, CDK8 est surexprimé dans les tumeurs et cellules colorectales et sa surexpression est d'ailleurs associée à un mauvais pronostic de survie [Seo *et al.*, 2010]. Deuxièmement, une surexpression de CDK8 dans les fibroblastes NIH3T3 entraîne la formation de foyers cellulaires, la capacité de croissance en indépendance d'ancrage et la formation de tumeurs lorsqu'elles sont injectées dans les souris immunodéficientes [Firestein *et al.*, 2008]. Troisièmement, l'inhibition de son expression par interférence d'ARN entraîne un ralentissement de la prolifération de certaines lignées cancéreuses colorectales présentant une surexpression de CDK8 [Firestein *et al.*, 2008]. Quatrièmement, une surexpression de CDK8 promeut l'état de

dédiﬀérenciation des cellules cancéreuses colorectales en agissant sur la transcription de c-Myc [Adler *et al.*, 2012]. En lien avec ces observations, les travaux de Firestein et collaborateurs ont récemment démontré que l'expression de CDK8 était nécessaire pour une activité transcriptionnelle optimale du complexe transcriptionnel β -caténine/TCF [Firestein *et al.*, 2008], un complexe crucial pour la prolifération des cellules normales et cancéreuses intestinales [Moran *et al.*, 2010]. Néanmoins, seulement une partie des effets oncogéniques de CDK8 sont inhibés par l'expression d'un mutant dominant-négatif de TCF4 suggérant que CDK8 puisse participer à la régulation d'autres voies de signalisation oncogéniques dans les cellules colorectales [Firestein *et al.*, 2008].

Une autre voie de signalisation activée lors de la carcinogénèse colorectale est la voie KRAS/MAP Kinase, avec des mutations de KRAS retrouvées dans 35 à 40% des cas [Worthley et Leggett, 2010] et des mutations dans l'oncogène BRAF dans 10 à 15% des cas [Di Fiore *et al.*, 2010]. Plusieurs des lignées cancéreuses colorectales étudiées possèdent d'ailleurs des mutations dans ces oncogènes. Ces mutations sont des mutations de type gain-de-fonction qui vont entraîner théoriquement une activation oncogénique des kinases en aval, MEK1/2 et ERK1/2. Nous avons donc traité les lignées cancéreuses colorectales avec un inhibiteur pharmacologique de MEK, le U0126. Le U0126 (ou 1'4-diamino-2'3dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiène) a tout d'abord été identifié comme un antagoniste cellulaire du facteur de transcription AP-1. C'est en cherchant à comprendre son mécanisme d'action, qu'il a été mis en évidence que le U0126 est aussi un inhibiteur de MEK. De plus, il a été démontré qu'il n'affectait pas les activités kinasiques de RAF ou de ERK, en faisant donc un inhibiteur spécifique des kinases MEK [Favata *et al.*, 1998]. Suite à ce traitement avec le U0126 sur les lignées cancéreuses colorectales humaines, nous avons observé une baisse plus ou moins importante de l'expression protéique de CDK8 dans la majorité des lignées cancéreuses colorectales étudiées suggérant que l'expression protéique de CDK8 dans ces lignées est partiellement dépendante de l'activité de MEK. Nous avons alors voulu savoir si cette régulation d'expression de CDK8 par la voie MEK/ERK était d'origine transcriptionnelle. Pour cela, nous avons étudié l'expression des transcrits de CDK8 dans les lignées cancéreuses

colorectales traitées ou non avec le U0126. Nous avons constaté que l'inhibition de MEK n'avait pas d'impact significatif sur l'expression en ARNm de CDK8 dans les lignées cancéreuses colorectales. D'abord surprenant, ce résultat peut néanmoins s'expliquer par le fait que ces lignées cancéreuses présentent un gain de copies du gène *CDK8* [Firestein *et al.*, 2008]. Ces résultats suggèrent aussi que la régulation de l'expression de CDK8 par MEK dans les lignées cancéreuses colorectales serait probablement post-transcriptionnelle, peut-être *via* le contrôle de sa stabilité. La stabilité de plusieurs protéines est souvent contrôlée par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation. Mentionnons qu'un site putatif de phosphorylation pour ERK1/2, la sérine 182, est présent sur CDK8. Ce site fut mis en évidence par le logiciel GPS (http://bioinformatics.lcd-ustc.org/gps_web) [Cagnol et Rivard, 2013]. Cependant, le rôle de cette sérine dans la régulation de la stabilité de la protéine CDK8 n'a jamais été étudié.

1.2 Surexpression de CDK8 dans les cellules épithéliales intestinales transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase

Suite aux résultats obtenus sur l'expression de CDK8 dans les lignées cancéreuses colorectales, nous avons choisi de travailler avec des modèles de transformation oncogénique plus simple, induite par les formes oncogéniques des principales protéines de la voie KRAS/MAP Kinase : KRAS^{G12V}, BRAF^{V600E} [Cagnol et Rivard, 2013] ou MEK1^{S218D/S222D}, une forme constitutive active de MEK1 (MEKca) [Boucher *et al.*, 2004; Lemieux *et al.*, 2009]. En effet, l'expression de ces différents oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase dans les cellules épithéliales intestinales normales, les IEC-6, est suffisante pour induire leur transformation morphologique et fonctionnelle [Boucher *et al.*, 2004, Voisin *et al.*, 2008; Lemieux *et al.*, 2009, Cagnol et Rivard, 2013]. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans cette transformation cellulaire, un microarray Affymetrix a été réalisé sur les cellules transformées par la forme constitutive active de MEK1 et sur les cellules contrôles exprimant la forme sauvage de MEK1 (MEKwt) [Bergeron *et al.*, 2010]. De nombreux gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (*cycline D1*) ainsi que dans la migration et l'adhésion cellulaire (*serpine*

E2), se sont avérés être augmentés par l'hyperactivation de MEK. Parmi ceux-ci, le gène *cdk8*, qui s'est retrouvé induit 12 fois. Nous avons donc, d'abord, confirmé l'expression de CDK8 dans les modèles de cellules IEC-6 transformées par l'expression du KRAS^{G12V}, du BRAF^{V600E} (inductible au tamoxifène) et du mutant de MEK1 constitutivement actif. Nous avons alors constaté que l'expression protéique de CDK8 est augmentée dans ces cellules transformées par rapport aux cellules contrôles. Suite au traitement de ces cellules transformées avec l'inhibiteur U0126, nous avons noté une inhibition de l'induction de l'expression protéique de CDK8 dans ces cellules. Ceci démontre que la hausse d'expression de la protéine CDK8 par ces oncogènes est dépendante de l'activation des kinases MEK dans ces modèles de transformation cellulaire.

Nous avons par la suite vérifié si cette régulation pouvait être transcriptionnelle en analysant le niveau des transcrits dans les cellules cancéreuses colorectale humaines, ainsi que dans les cellules IEC-6 transformées par l'expression de KRAS^{G12V} ou de BRAF^{V600E}. Nous avons pu constater qu'il n'y avait pas de variation du transcrit de *CDK8* dans les lignées cancéreuses colorectales, cependant une induction de celui-ci a été mise en évidence dans les cellules IEC-6 transformées par l'expression de KRAS^{G12V} ou de BRAF^{V600E}. L'absence de variation d'expression du transcrit de CDK8 dans les lignées cancéreuses colorectales humaines peut s'expliquer par le gain de copies du gène *CDK8* retrouvé régulièrement dans les lignées cancéreuses colorectales [Firestein *et al.*, 2008]. Alors que, l'induction d'expression du transcrit de *cdk8* dans les cellules IEC-6 transformées par l'expression du KRAS^{G12V} ou du BRAF^{V600E}, ainsi que celle mise en évidence par le microarray dans les cellules exprimant le mutant constitutivement actif de MEK1 [Bergeron *et al.*, 2010], suggèrent que la hausse d'expression de CDK8 par l'activation oncogénique de la voie KRAS/MAP Kinase peut également être régulée de façon transcriptionnelle dans ces modèles cellulaires. De plus, le traitement des cellules IEC-6 BRAF^{V600E} avec le U0126, semble rétablir les niveaux de transcrits de *cdk8* au niveau des cellules contrôles. Ceci confirme que la régulation transcriptionnelle de l'expression de *cdk8* est dépendante de l'activation des kinases MEK dans ce modèle cellulaire.

Ces résultats pris ensemble sur l'expression de CDK8 dans les lignées cancéreuses colorectales et dans les cellules IEC-6 transformées par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase, suggèrent que cette voie de signalisation peut non seulement réguler l'expression de CDK8 de façon transcriptionnelle, mais également de façon post-traductionnelle.

1.3 L'induction de l'expression de CDK8 précède la transformation oncogénique

Comme nous avons pu le constater, la surexpression de la protéine CDK8 est détectée dès les stades précoces de la carcinogénèse [Seo *et al.*, 2010]. Les modèles de cellules IEC-6 exprimant le KRAS^{G12V} et le MEK1^{S218D/S222D}, présente une transformation oncogénique déjà établie. Afin de vérifier si l'induction de l'expression de CDK8 pouvait se produire avant et/ou pendant l'établissement de la transformation oncogénique des cellules épithéliales intestinales, nous avons utilisé les cellules IEC-6 BRAF^{V600E} stimulées ou non au tamoxifène. Nous avons pu constater que l'induction de l'expression protéique de CDK8 par l'activation oncogénique de BRAF avait lieu avant la transformation morphologique des cellules, puis que cette surexpression restait stable au cours du temps. Ceci suggère donc que la transformation des cellules épithéliales intestinales exprimant les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase pourrait être dépendante d'une hausse préalable de l'activité de CDK8.

2. Contribution de CDK8 à la transformation des cellules épithéliales intestinales induite par l'activation oncogénique de la voie KRAS/MAP Kinase.

Afin de valider l'hypothèse selon laquelle CDK8 contribuerait à la transformation des cellules épithéliales intestinales induite par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase, nous avons inhibé l'expression de CDK8 dans les modèles de cellules IEC-6 BRAF^{V600E}ER et IEC-6 MEKca *via* un shARN spécifique. Par la suite, nous avons étudié

l'impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur les différentes caractéristiques typiques des cellules transformées : la prolifération, la croissance en indépendance d'ancrage et la morphologie cellulaire.

2.1 Impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur la prolifération des cellules IEC-6 BRAF^{V600E}ER et IEC-6 MEKca

Nous avons pu constater par une expérience d'incorporation du BrdU dans les cellules IEC-6 BRAF^{V600E}, une diminution du nombre de cellules en phases S en présence de tamoxifène, suggérant un ralentissement du cycle cellulaire et donc de la prolifération dans les cellules exprimant l'oncogène BRAF^{V600E} et sous-exprimant CDK8. En accord avec ces résultats, dans les cellules IEC-6 exprimant le MEK1^{S218D/S222D}, nous avons aussi observé une tendance à la diminution de la vitesse de leur prolifération lorsque l'expression de CDK8 était diminuée. Cependant et de manière intéressante, la baisse d'expression de CDK8 dans les cellules contrôles (exprimant le MEK sauvage), considérées comme *normales*, ne semble pas affecter de manière importante leur prolifération du moins, avec le temps, après 11 jours. Pris ensemble, ces résultats suggèrent donc que CDK8 contrôle préférentiellement la prolifération des cellules transformées.

Ces résultats rappellent ceux obtenus dans certaines lignées cancéreuses colorectales humaines dans lesquelles l'expression d'un shARN dirigé contre CDK8 ralentit aussi la prolifération cellulaire [Firestein *et al.*, 2008]. Cette diminution de la prolifération fut mise en évidence dans les cellules cancéreuses colorectales présentant une forte expression de CDK8. Au contraire, dans les cellules cancéreuses ne présentant pas cette surexpression, l'inhibition de l'expression de CDK8 n'influence pratiquement pas leur prolifération. Ainsi, les cellules présentant une surexpression de CDK8 deviennent donc dépendantes de cette kinase pour leur prolifération [Firestein *et al.*, 2008]. Ceci rappelle le phénomène d'addiction oncogénique dans lequel la cellule cancéreuse devient dépendante d'un

oncogène ou de quelques oncogènes pour maintenir sa survie et son phénotype tumoral [Singh *et al.*, 2012]. De manière plus convaincante, nous avons aussi observé que la baisse d'expression de CDK8 dans les cellules IEC-6 exprimant le MEK1^{S218D/S222D} bloquait presque complètement leur capacité de croître en indépendance d'ancrage. En effet, suite à des essais en agarose mou, une diminution de près de 94% du nombre de colonies formées par les cellules IEC-6 MEKca déficientes pour l'expression de CDK8 a été observée. CDK8 semble donc particulièrement impliquée dans l'acquisition du potentiel à croître en indépendance d'ancrage survenant durant la transformation cellulaire. D'ailleurs, il a été montré que la surexpression de CDK8 dans des fibroblastes murins immortalisés (NIH3T3), induit la formation de foyers, la croissance de colonies en indépendance d'ancrage, ainsi que la formation de tumeurs lorsqu'elles sont injectées dans des souris immunodéficientes [Firestein *et al.*, 2008]. De plus, des résultats encore non publiés et obtenus dans le laboratoire de la P^{re} N. Rivard par un étudiant à la maîtrise, G. Chevalier-Soudeyngs, ont aussi mis en évidence que l'inhibition de l'expression de CDK8 *via* le shARN dans les cellules cancéreuses humaines HT-29, entraîne également un ralentissement important de leur prolifération, ainsi que leur potentiel à croître en indépendance d'ancrage.

Nous avons donc constaté que l'inhibition de CDK8 sur les cellules IEC-6 MEKca affectait beaucoup plus fortement leur potentiel de croissance en indépendance d'ancrage que leur prolifération en monocouche. Comment peut-on expliquer cette différence ? Premièrement, les courbes de prolifération en monocouche ont été réalisées dans des conditions de milieu normal contenant 5% de sérum. Il est donc fort possible que la présence de sérum ait pu activer d'autres voies de signalisation telles que PI3K/Akt ou JNK/MAPK, impliquées dans la prolifération des cellules tumorales intestinales [Yamada et Araki, 2001; Wagner et Nebreda, 2009] et capables de compenser pour la perte de CDK8. Il serait donc intéressant de renouveler ces essais de prolifération en réduisant la quantité de sérum, afin de mieux visualiser l'effet de l'inhibition de CDK8. Il faut aussi mentionner que le shARN dirigé contre CDK8 réduisait d'environ 50% l'expression de CDK8. Or, il est possible que l'expression résiduelle de CDK8 puisse être suffisante pour

maintenir la prolifération des cellules transformées, du moins en monocouche. Lorsqu'ensemencées dans un milieu partiellement gélifié, par exemple de l'agar ou de l'agarose, les cellules sont ainsi placées dans un environnement beaucoup plus hostile et stringent car limitant leur adhérence à un substrat. Seules les cellules ayant acquis une capacité de résister à l'absence d'ancrage et de proliférer en suspension vont pouvoir survivre. L'effet important de la diminution d'expression de CDK8 sur le potentiel de croissance en indépendance d'ancrage suggère que cette kinase pourrait avoir un rôle à jouer dans la transcription de gènes cibles indispensables à la croissance cellulaire dans ces conditions difficiles. En effet, l'aptitude des cellules à proliférer dépend de deux types de signaux. Le premier est établi par les intégrines qui permettent d'activer différentes cascades de signalisation pour répondre aux stimuli externes, et le second est la présence de facteurs de croissance [Guadamillas *et al.*, 2011]. Étant donné que les courbes de prolifération et les essais de croissance en indépendance d'ancrage ont été réalisés dans les mêmes conditions de sérum, cela suggère que la différence des résultats obtenus est surtout liée aux signaux émis par les intégrines.

Pris ensemble, ces résultats suggèrent fortement que CDK8 est importante pour la transformation néoplasique des cellules épithéliales intestinales induite par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase.

2.2 Impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur la transformation morphologique des cellules exprimant les formes oncogéniques de BRAF ou de MEK1

2.2.1 Rôle de CDK8 dans la morphologie cellulaire

Les cellules IEC-6 BRAF^{V600E}ER acquièrent rapidement une morphologie fibroblastique lorsqu'elles sont stimulées au tamoxifène [Cagnol et Rivard, 2013].

L'inhibition de l'expression de CDK8 *via* le shARN atténue clairement cette transformation morphologique. En effet, les cellules IEC-6 BRAF^{V600E}ER shCDK8 démontrent un phénotype plus épithélial et cuboïdal et ont une meilleure adhérence à la matrice que les cellules exprimant de bons niveaux de CDK8. Des travaux menés par Étienne Lemieux dans notre laboratoire ont démontré que l'expression du mutant constitutif actif de MEK1 dans les cellules épithéliales intestinales IEC-6 entraîne une transition épithélium-mésenchyme [Lemieux *et al.*, 2009]. En effet, l'hyperactivation de MEK1 dans ces cellules diminue fortement le niveau d'expression des protéines jonctionnelles au profit de l'expression de marqueurs de type mésenchymateux. D'ailleurs, les cellules exprimant la forme hyperactive de MEK1 ont perdu leur morphologie épithéliale et ont acquis une morphologie allongée et fibroblastique. En effet, il a été mis en évidence que les cellules IEC-6 MEKca présentaient une désorganisation complète de l'actine filamenteuse et une perte de l'actine corticale [Lemieux *et al.*, 2009], ainsi qu'une délocalisation des points d'adhésion. De manière intéressante, nous avons observé que l'inhibition d'expression de CDK8 entraîne un retour partiel de ces cellules à un phénotype plus épithélial. De plus, nos expériences d'immunofluorescences montrent que l'inhibition d'expression de CDK8 dans ces cellules entraîne une réorganisation partielle de l'actine filamenteuse avec un retour de l'actine corticale de même qu'un retour partiel des points focaux d'adhésions. Ces résultats suggèrent donc que CDK8 est impliquée dans les changements de morphologie survenant lors de la transformation cellulaire. Jusqu'à présent, CDK8 était surtout connue pour son rôle positif dans la transcription de gènes cibles du complexe transcriptionnel β -caténine/TCF [Firestein *et al.*, 2008], de gènes de réponses précoces suite à une stimulation au sérum [Donner *et al.*, 2010] et de gènes cibles du facteur transcriptionnel HIF1 α [Galbraith *et al.*, 2013]. Parmi ces gènes cibles, certains ont été déjà associés à des changements de morphologie cellulaire comme par exemples : *Snail1* (cible de la voie Wnt/ β -caténine) [Peinado *et al.*, 2004], ou *CYR61* (gène dépendant de CDK8 suite à une stimulation au sérum) [Donner *et al.*, 2010], ou *vimentine* (cible de HIF1 α) [Semenza, 2003]. Outre ces gènes, nos résultats pourraient aussi suggérer que CDK8 module aussi plus directement l'expression de gènes encodant pour des protéines associées au cytosquelette, à l'adhésion cellulaire et à l'établissement des contacts cellule-cellule.

2.2.2 CDK8 est impliquée dans la régulation des gènes associés à l'EMT

Tel que mentionné précédemment, les cellules transformées par la forme constitutive active de MEK1 subissent une transition épithélium-mésenchyme [Lemieux *et al.*, 2009]. Cette transition a d'ailleurs été caractérisée : 1) par des modifications morphologiques conduisant une monocouche de cellules épithéliales polarisées à se disperser en cellules mésenchymateuses avec des extensions migratoires, 2) par la perte de marqueurs de polarisation épithéliale tels que des protéines de jonctions cellule-cellule (E-cadhérine) et l'acquisition de protéines mésenchymateuses telles que la vimentine et la fibronectine, 3) et par un changement fonctionnel des cellules passant d'un état stationnaire à un état motile capable d'envahir la matrice extracellulaire [Yang et Weinberg, 2008]. De manière intéressante, nous avons noté dans les cellules IEC-6 MEKca et dans lesquelles nous avons inhibé l'expression de CDK8, le retour, modeste mais néanmoins détectable, de l'expression protéique de la E-cadhérine. Ceci suggère une certaine contribution de CDK8 dans l'induction de l'EMT dans les cellules épithéliales intestinales.

Les facteurs de transcription Snail1 et Snail2 sont connus pour réprimer l'expression de la E-cadhérine et être directement impliqués dans l'induction de l'EMT [Peinado *et al.*, 2004; Batlle *et al.*, 2000]. Nos résultats montrent que l'inhibition de l'expression de CDK8 dans les cellules IEC-6 transformées par MEKca diminue d'un peu plus de 50% l'expression de Snail1 et plus modestement l'expression de Snail2. Ainsi, cette tendance à la diminution de l'expression des facteurs de transcription Snail1 et Snail2, inhibiteurs de la transcription du gène de la E-cadhérine peut expliquer la réexpression de celle-ci lors de l'inhibition d'expression de CDK8 dans les cellules IEC-6 MEKca. Cette tendance à la baisse d'expression de Snail1 et Snail2 dans les cellules déficientes pour CDK8 pourrait être expliquée par le fait que CDK8 contrôle l'expression des facteurs de transcription Egr-1 et Fra-1, [Donner *et al.*, 2010, G Chevalier-Soudeyins, résultats non publiés], des facteurs capables de lier et d'activer les promoteurs de ces gènes [Lemieux *et al.*, 2009].

Ainsi, pris ensemble, nos résultats montrent que l'hyperactivation de la signalisation MEK/ERK induit l'expression de CDK8 qui permettrait une expression optimale de Snail1 et Snail2. L'expression de ces facteurs Snail1 et Snail2 mène alors à la répression de la transcription de la E-cadhérine et d'autres protéines de jonctions [Peinado et al., 2004; Battle *et al.*, 2000], aboutissant à une transition épithélium-mésenchyme (Figure 22).

2.2.3 CDK8 régule l'expression de Gem.

Suite à la réalisation d'un microarray dans les cellules cancéreuses colorectales HCT116 déficientes ou non pour l'expression de CDK8, Donner et collaborateurs (2010) ont mis en évidence que CDK8 était importante pour l'induction de nombreux gènes en réponse au sérum. Ces gènes régulés par l'expression de CDK8 sont très divers et incluent des gènes codant pour des facteurs de transcription (*FOS*, *EGR1*, *EGR2*, *EGR3*), des protéines impliquées dans l'adhésion (*CYR61*, *THBS1*) et dans la morphologie cellulaire (*GEM*). Parmi ces gènes, celui codant pour la protéine Gem a attiré particulièrement notre attention.

Gem est une petite protéine GTPasique appartenant à la grande famille des protéines RAS et de la sous-famille des RGK (Rad, Gem, Kir). La structure basique des protéines RGK consiste en un *core* semblable à la protéine RAS entouré d'une extension en N-terminal et en C-terminal. Cependant, contrairement aux protéines de la famille RAS, les RGK possèdent une activité GTPasique intrinsèque quasi inexistante [Cohen *et al.*, 1994; Finlin *et al.*, 2000]. D'autres mécanismes de régulation de l'activité des protéines RGK ont été mis en évidence incluant la régulation transcriptionnelle [Maguire *et al.*, 1994], ainsi que la phosphorylation sur des sites localisés dans les extensions N- et C-terminales [Maguire *et al.*, 1994]. Bien que le rôle physiologique de ces protéines RGK soit encore mal connu, la protéine Gem quant à elle, régulariserait le cytosquelette d'actine [Piddini *et al.*, 2001]. D'ailleurs, Gem possède de nombreux sites de phosphorylation dont les sérines 289 et 261 localisées dans l'extension C-terminale et rapportées pour être impliquées dans

la régulation de la structure du cytosquelette d'actine [Ward *et al.*, 2004]. Cette action de Gem serait attribuable à son interaction avec la Rho-kinase (ROCK), empêchant ainsi le recrutement de ses substrats [Ward *et al.*, 2002]. Il existe deux isoformes de ROCK, α et β , qui sont des protéines effectrices de Rho, connues pour jouer un rôle fondamental dans la formation des fibres de stress et des points d'adhésion focaux dans les fibroblastes et les cellules épithéliales [Totsukawa *et al.*, 2004]. Plus spécifiquement, ROCK phosphoryle la protéine MLC entraînant son activation qui va conduire à des changements morphologiques [Kimura *et al.*, 1996]. Il a été mis en évidence que Gem lie ROCK β sur son domaine *coiled-coiled* à proximité du site d'interaction de Rho, empêchant ainsi la phosphorylation de MLC [Ward et Kelly, 2006]. D'ailleurs, dans les cellules épithéliales et les fibroblastes, Gem entraîne le désassemblage des fibres de stress et des points d'adhésion focaux centraux [Ward et Kelly, 2006].

Il est intéressant de se rappeler que la désorganisation du cytosquelette d'actine et des points d'adhésion focaux sont des caractéristiques phénotypiques importantes observées lors de la transformation des cellules épithéliales par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase [Cagnol et Rivard, 2013; Lemieux *et al.*, 2009]. De plus, nos résultats suggèrent que l'expression des transcrits de Gem serait induite par l'expression des formes oncogéniques de la voie KRAS/MAP Kinase. Ainsi, Gem pourrait participer aux changements morphologiques observés lors de la transformation oncogénique des cellules épithéliales intestinales. La surexpression de Gem dans diverses lignées cellulaires est d'ailleurs suffisante pour induire leur transformation morphologique et une désorganisation de l'architecture des filaments d'actine [Piddini *et al.*, 2001].

Il a déjà été rapporté, dans les cellules cancéreuses colorectales, que l'activation de Fra-1 par les kinases ERK entraîne une dérégulation de la voie de signalisation Rho/ROCK, maintenant une désorganisation du cytosquelette d'actine dans ces cellules [Pollock *et al.*, 2005]. Nos résultats préliminaires, qui devront cependant être confirmés, suggèrent que l'induction des transcrits de Gem dans les cellules exprimant le BRAF oncogénique pourrait dépendre de CDK8. Ainsi, nous pouvons spéculer que la hausse de CDK8

observée suite à l'hyperactivation de la voie KRAS/MAP Kinase augmente l'expression du facteur de transcription Fra-1 [Lemieux *et al.*, 2009] qui, à son tour, entraînerait l'expression de la protéine Gem qui va inhiber ROCK β , induisant une désorganisation du cytosquelette d'actine. Il serait donc pertinent de surexprimer la protéine Gem dans nos cellules IEC-6 transformées et sous-exprimant CDK8 afin de vérifier si cela suffit à restaurer leur phénotype fibroblastique mésenchymateux. D'autres expériences devront être effectuées dans le futur pour mieux comprendre le rôle de Gem dans la transformation morphologique et oncogénique des cellules épithéliales intestinales (Figure 22).

Finalement, il est pertinent de mentionner qu'une surexpression de Gem a été mise en évidence dans des lignées cellulaires de neuroblastomes et de mélanomes [Leone *et al.*, 2001], et que son expression a déjà été détectée de façon sporadique dans des cancers d'origine épithéliale [Leone *et al.*, 2001]. Il pourrait donc être intéressant de compléter notre étude de Gem par l'analyse de son expression dans des tumeurs colorectales de patients.

3. CDK8 : une cible thérapeutique dans le cancer colorectal ?

Nous avons pu mettre en évidence que CDK8 contribue à la transformation oncogénique des cellules épithéliales intestinales induite par les oncogènes de la voie KRAS/MAP Kinase. De manière intéressante, CDK8 a été aussi impliquée dans le potentiel tumorigénique lié à l'hyperactivation de la voie Wnt/ β -caténine [Firestein *et al.*, 2008; Seo *et al.*, 2010]. Rappelons que la vaste majorité des tumeurs colorectales présentent des mutations activatrices dans l'une de ces deux voies de signalisation [Moran *et al.*, 2010 ; Worthley et Leggett, 2010]. Ainsi, nous pouvons proposer que CDK8 serait une bonne cible thérapeutique pour le traitement du cancer colorectal, puisque qu'elle est impliquée dans les deux principales voies de signalisation oncogéniques mutées dans le cancer colorectal. En effet, en ciblant la kinase CDK8 avec un inhibiteur pharmacologique, par exemple, on pourrait diminuer le potentiel prolifératif et invasif des tumeurs colorectales. Il

a d'ailleurs récemment été rapporté que la Senexine-A, un composé capable d'inhiber CDK8, améliorait l'efficacité des traitements de chimiothérapie dans les cellules cancéreuses colorectales humaines en culture [Porter *et al.*, 2012].

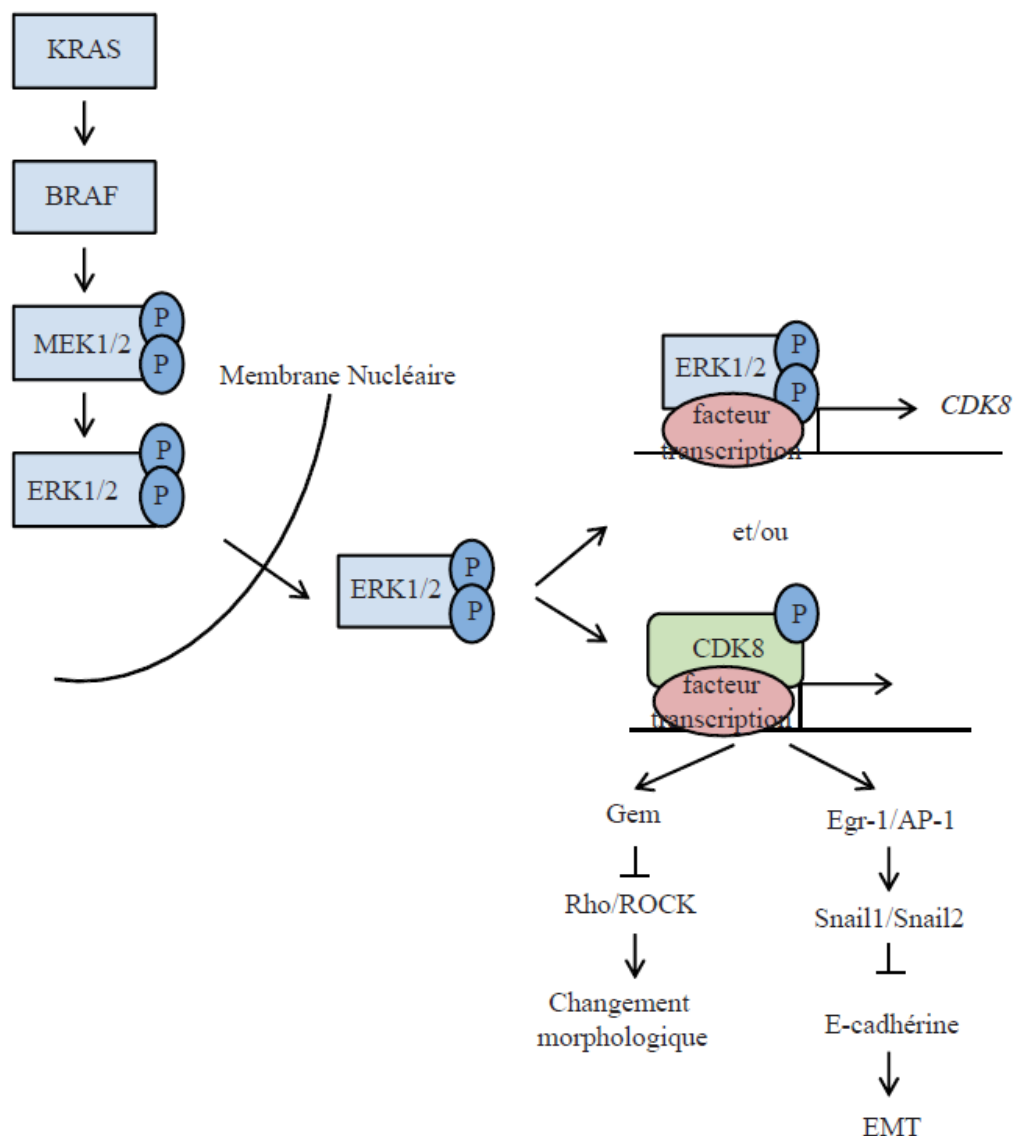


Figure 22: Régulation de CDK8 par la voie KRAS/MAP Kinase durant la transformation des cellules de l'épithélium intestinal.

L'activation de la voie KRAS/MAP Kinase peut induire l'expression de CDK8 ou peut-être sa stabilisation. CDK8 serait impliquée durant la transformation des cellules de l'épithélium intestinal, en permettant la transcription de différents facteurs impliqués dans la transformation oncogénique, particulièrement dans la transformation morphologique. En effet, CDK8 est importante pour la transcription des gènes encodant Snail1 et Snail2, répresseurs de la E-cadhérine. L'induction de Snail1 et Snail2 pourrait être médiée par les facteurs de transcriptions Egr-1 et AP-1, connus pour être induits par CDK8 (Donner *et al.*, 2010) et rapportés pour lier et activer directement les promoteurs de Snail1 et Snail2 (Lemieux *et al.*, 2009). CDK8 est aussi impliquée dans l'expression de la protéine Gem capable d'inhiber la protéine ROCK, entraînant une désorganisation du cytosquelette d'actine.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Lors de cette étude nous avons pu mettre en évidence que l'expression des oncogènes KRAS et BRAF, deux oncogènes importants dans la carcinogénèse colorectale, induisaient une augmentation de l'expression de la protéine CDK8. De plus, nos résultats montrent une contribution importante pour cette kinase dans l'acquisition de certaines propriétés tumorales, notamment la capacité de croître en indépendance d'ancrage. De façon intéressante, nos résultats suggèrent que la voie KRAS/MAP Kinase pourrait réguler l'expression de CDK8 de façon transcriptionnelle, mais aussi potentiellement de façon post-traductionnelle. Nous avons d'ailleurs mis en évidence par analyse bio-informatique, un site putatif de phosphorylation de CDK8 par ERK1/2, la sérine 182 [Cagnol et Rivard, 2013]. Il faudrait donc réaliser un essai kinase de ERK1/2 sur CDK8, *in vitro*, pour valider cette phosphorylation. Par la suite, il faudrait réaliser par mutagenèse dirigée des mutants de CDK8 soit non phosphorylable, soit phospho-mimétique. Ces mutants permettraient de déterminer si la phosphorylation de CDK8 par ERK pourrait agir sur son activité, sa stabilisation et/ou sa localisation. Dans ce cas, l'expression des mutants non phosphorylable et phospho-mimétique pourrait être par la suite testée sur la transformation cellulaire.

De plus, nous avons pu mettre en évidence que l'induction de l'expression de CDK8 par la voie KRAS/MAP Kinase, non seulement précédait le phénomène de transformation mais semblait particulièrement importante pour l'établissement d'un phénotype transformé, au niveau de la morphologie, du potentiel de croissance en indépendance d'ancrage et pour la prolifération. Par conséquent, il serait particulièrement pertinent d'évaluer l'impact de l'inhibition de CDK8 sur la capacité des cellules transformées à former des tumeurs chez la souris immunodéficientes. D'un autre côté, il serait également intéressant de surexprimer CDK8 dans les cellules épithéliales intestinales normales afin de vraiment confirmer si CDK8 est véritablement un oncogène pour ces cellules. En effet, Firestein et collaborateurs (2008) ont mis en évidence que la surexpression de CDK8 dans les fibroblastes murins immortalisés était suffisante pour induire leur transformation (formation de foyers, capacité de croissance en indépendance d'ancrage et formation de tumeurs). La réalisation d'une

souris transgénique surexprimant CDK8 spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales apporterait aussi des résultats *in vivo*, sur l'effet de CDK8 sur la prolifération, les gènes cibles de CDK8 et son éventuel potentiel tumoral dans un contexte intestinal.

En outre, quelques résultats qui devront être confirmés, nous permettent néanmoins de suggérer que CDK8 pourrait être impliquée dans la transcription de gènes liés à la morphologie cellulaire comme des gènes impliqués dans l'EMT, *Snail1* et *Snail2*, ou bien *Gem*, impliquée dans l'organisation de l'actine. Nous avons également spéculé, au vu des résultats de l'impact de l'inhibition de CDK8 sur le potentiel de croissance en indépendance d'ancrage des cellules IEC-6 MEKca, que CDK8 pourrait également être impliquée dans l'expression de facteurs permettant la survie en indépendance d'ancrage. Des candidats intéressants pourraient des facteurs anti-apoptotiques tels que des membres de la famille Bcl-2 [Guadamillas *et al.*, 2001], rapportés pour être impliqués dans la résistance à l'anoïkose des cellules cancéreuses colorectales.

Une autre expérience intéressante serait de réaliser un microarray dans les cellules exprimant de manière inductible l'oncogène BRAF, afin d'identifier les gènes modulés par CDK8 et susceptibles d'être impliqués dans l'initiation de la transformation tumorale. Par la suite, on pourrait essayer de comprendre comment CDK8 est impliquée dans la régulation de l'expression de ces gènes cibles. En effet, il a été mis en évidence que CDK8 contrôlait surtout la phase d'élongation de la transcription plutôt que la phase d'initiation [Galbraith *et al.*, 2013]. Pour démontrer le mécanisme par lequel CDK8 régule l'expression des différents gènes cibles, il faudra réaliser des expériences d'immunoprécipitations de la chromatine (ChIP).

Enfin dans des perspectives à plus long terme, afin de déterminer si CDK8 pourrait être une bonne cible thérapeutique pour réguler la transformation oncogénique induite par l'hyperactivation de la voie KRAS/MAP Kinase, des xénogreffes chez la souris immunodéficiente pourraient être effectuées en utilisant des cellules transformées par

l'expression de l'oncogène KRAS ou du MEK1 constitutivement actif, puis traiter ces souris avec un inhibiteur de CDK8, comme par exemple la Senexine-A [Porter *et al.*, 2012].

REMERCIEMENTS

Avant de clore cette étude j'aimerais remercier plusieurs personnes qui m'ont aidée tout au long de l'avancée de ce projet.

Tout d'abord, je souhaite remercier la P^{re} Nathalie Rivard ainsi que le Pr Claude Asselin, mes directeurs de recherche pour m'avoir offert l'opportunité de travailler sur ce sujet et m'avoir accueillie dans leur laboratoire.

Ensuite, je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire : Etienne Lemieux, Benjamin Bian, Geneviève Coulombe, Caroline Leblanc, Amélie Montagne, Sébastien Cagnol, Marie-Josée Langlois et Anne Vézina. Merci à vous pour votre contribution dans la réussite de ce projet que ce soit par les discussions scientifiques, l'aide technique, l'apprentissage mais aussi le soutien moral.

Et enfin je tiens également à remercier le Pr François-Michel Boisvert et la P^{re} Christine Lavoie, pour avoir pris de leur temps afin de corriger mon travail.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Adler, A.S., McClelland, M.L., Truong, T., Lau, S., Modrusan, Z., Soukup, T.M., Roose-Girma, M., Blackwood, E.M., Firestein, R. (2012) CDK8 maintains tumor dedifferentiation and embryonic stem cell pluripotency. *Cancer Research* 72 : 2129-2139.
- Alarcon, C., Zaromytidou, A.I., Xi, Q., Gao, S., Yu, J., Fujisawa, S., Barlas, A., Miller, A.N., Manova-Todorova, K., Macias, M.J., Sapkota, G., Pan, D., Massague, J. (2009) Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. *Cell* 139 : 757-769.
- Altieri, F., Arcari, P., Rippa, E. (2012) Gastric Cancer : Molecular Pathology State. Dans G. Mozsik (Eds). Current Topics in Gastritis. Italie (Chapitre 13). 241-260.
- Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., Garcia De Herreros, A. (2000) The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biology* 2 : 84-89.
- Baum, B., Settleman, J., Quinlan, M.P. (2008) Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19 : 294-308.
- Bergeron, S., Lemieux, E., Durand, V., Cagnol, S., Carrier, J.C., Lussier, J.G., Boucher, M.J., Rivard, N. (2010) The serine protease inhibitor serpinE2 is a novel target of ERK signaling involved in human colorectal tumorigenesis. *Molecular Cancer* 9 : 271-4598-9-271.
- Bienz, M., Clevers, H. (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103 : 311-320.
- Boucher, M.J., Jean, D., Vezina, A., Rivard, N. (2004) Dual role of MEK/ERK signaling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver* 286 : 736-746.
- Brand, T.M., Wheeler, D.L. (2012) KRAS mutant colorectal tumors: past and present. *Small GTPases* 3 : 34-39.
- Cagnol, S., Rivard, N. (2013) Oncogenic KRAS and BRAF activation of the MEK/ERK signaling pathway promotes expression of dual-specificity phosphatase 4 (DUSP4/MKP2) resulting in nuclear ERK1/2 inhibition. *Oncogene* 32 : 564-576.
- Calvisi, D.F., Ladu, S., Conner, E.A., Seo, D., Hsieh, J.T., Factor, V.M., Thorgeirsson, S.S. (2011) Inactivation of Ras GTPase-activating proteins promotes unrestrained activity of wild-type Ras in human liver cancer. *Journal of Hepatology* 54 : 311-319.
- Chambard, J.C., Lefloch, R., Pouyssegur, J., Lenormand, P. (2007) ERK implication in cell cycle regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773 : 1299-1310.
- Cohen, L., Mohr, R., Chen, Y., Huang, M., Kato, R., Dorin, D., Tamanoi, F., Goga, A., Afar, D., Rosenberg, N., Witte, O., (1994) Rad, Gem/Kir and mRam (RGK) represent a

unique GTPase family with largely unknown functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States* 31 : 12448-12452.

Cullen, P.J. Lockyer, P.J. (2002) Integration of calcium and Ras signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3 : 339-348.

Davis, R.J. (1995) Transcriptional regulation by MAP kinases. *Molecular Reproduction & Development* 42 : 459-467.

Di Fiore, F., Sesboue, R., Michel, P., Sabourin, J.C., Frebourg, T. (2010) Molecular determinants of anti-EGFR sensitivity and resistance in metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 103 : 1765-1772.

Donner, A.J., Ebmeier, C.C., Taatjes, D.J., Espinosa, J.M. (2010) CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network. *Nature Structure & Molecular Biology* 17 : 194-201.

Fang, J.Y., Richardson, B.C. (2005) The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *The Lancet Oncology* 6 : 322-327.

Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feese, W.S., Van Dyk, D.E., Pitts, W.J., Earl, R.A., Hobbs, F., Copeland, R.A., Magolda, R.L., Scherle, P.A., Trzaskos, J.M. (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 273 : 18623-18632.

Fearon, E.R. (2011) Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual Review of Pathology* 6 : 479-507.

Finlin, B.S., Shao, H., Kadono-Okuda, K., Guo, N., Andres, D.A. (2000) Rem2, a new member of the Rem/Rad/Gem/Kir family of Ras-related GTPases. *Biochemical Journal* 347 : 223-231.

Firestein, R., Bass, A.J., Kim, S.Y., Dunn, I.F., Silver, S.J., Guney, I., Freed, E., Ligon, A.H., Vena, N., Ogino, S., Chheda, M.G., Tamayo, P., Finn, S., Shrestha, Y., Boehm, J.S., Jain, S., Bojarski, E., Mermel, C., Barretina, J., Chan, J.A., Baselga, J., Tabernero, J., Root, D.E., Fuchs, C.S., Loda, M., Shivdasani, R.A., Meyerson, M., Hahn, W.C. (2008) CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity. *Nature* 455 : 547-551.

Fryer, C.J., White, J.B., Jones, K.A. (2004) Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Molecular Cell* 16 : 509-520.

Furumoto, T., Tanaka, A., Ito, M., Malik, S., Hirose, Y., Hanaoka, F., Ohkuma, Y. (2007) A kinase subunit of the human mediator complex, CDK8, positively regulates transcriptional activation. *Genes Cells* 12; 119-132.

Galbraith, M.D., Allen, M.A., Bensard, C.L., Wang, X., Schwinn, M.K., Qin, B., Long, H.W., Daniels, D.L., Hahn, W.C., Dowell, R.D., Espinosa, J.M. (2013) HIF1A employs CDK8-mediator to stimulate RNAPII elongation in response to hypoxia. *Cell* 153 : 1327-1339.

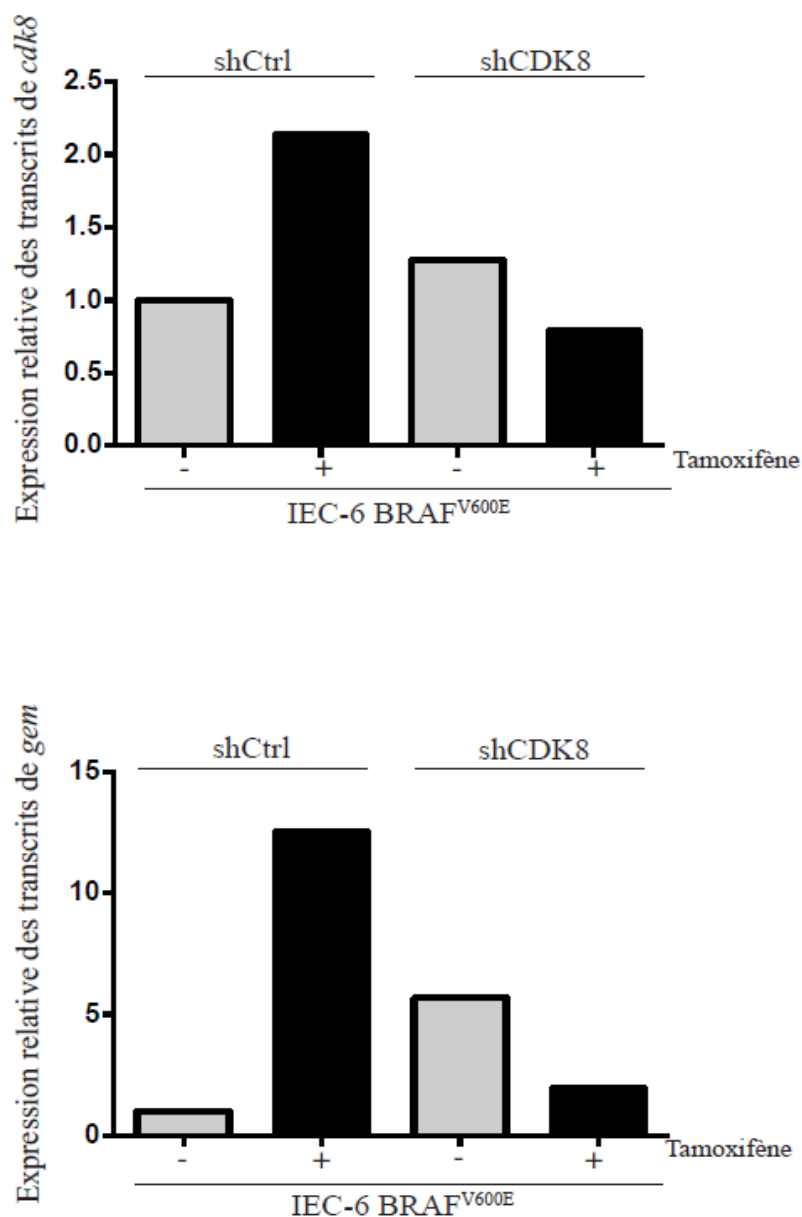
- Galbraith, M.D., Donner, A.J., Espinosa, J.M. (2010) CDK8: a positive regulator of transcription. *Transcription* 1 : 4-12.
- Guadamillas, M.C., Cerezo, A., Del Pozo, M.A. (2011) Overcoming anoikis--pathways to anchorage-independent growth in cancer. *Journal of Cell Science* 124 : 3189-3197.
- Guarino, M., Rubino, B., Ballabio, G. (2007) The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 39 : 305-318.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273 : 245-248.
- Knuesel, M.T., Meyer, K.D., Bernecky, C., Taatjes, D.J. (2009) The human CDK8 subcomplex is a molecular switch that controls Mediator coactivator function. *Genes & Development* 23 : 439-451.
- Komatsu, K., Buchanan, F.G., Otaka, M., Jin, M., Odashima, M., Horikawa, Y., Watanabe, S., Dubois, R.N. (2006) Gene expression profiling following constitutive activation of MEK1 and transformation of rat intestinal epithelial cells. *Molecular Cancer* 5 : 63.
- Kuhnert, F., Davis, C.R., Wang, H.T., Chu, P., Lee, M., Yuan, J., Nusse, R., Kuo, C.J. (2004) Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States* 101 : 266-271.
- L'Allemain, G. (2006) Role of the Wnt pathway in oncogenesis. *Bulletin du Cancer* 93 : 88-97.
- Liao, S.M., Zhang, J., Jeffery, D.A., Koleske, A.J., Thompson, C.M., Chao, D.M., Viljoen, M., van Vuuren, H.J., Young, R.A. (1995) A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* 374 : 193-196.
- Lee, J.M., Dedhar, S., Kalluri, R., Thompson, E.W. (2006) The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of Cell Biology* 172 : 973-981.
- Lemieux, E., Bergeron, S., Durand, V., Asselin, C., Saucier, C., Rivard, N. (2009) Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis. *International Journal of Cancer* 125 : 1575-1586.
- Leone, A., Mitsiades, N., Ward, Y., Spinelli, B., Poulaki, V., Tsokos, M., Kelly, K. (2001) The Gem GTP-binding protein promotes morphological differentiation in neuroblastoma. *Oncogene* 20 : 3217-3225.
- Maguire, J., Santoro, T., Jensen, P., Siebenlist, U., Yewdell, J., Kelly, K. (1994) Gem: an induced, immediate early protein belonging to the Ras family. *Science* 265 : 241-244.
- Marshall, N.F., Peng, J., Xie, Z., Price, D.H. (1996) Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 271 : 27176-27183.

- Matsubara, K., Kishida, S., Matsuura, Y., Kitayama, H., Noda, M., Kikuchi, A. (1999) Plasma membrane recruitment of RalGDS is critical for Ras-dependent Ral activation. *Oncogene* 18 : 1303-1312.
- Meyer, K.D., Donner, A.J., Knuesel, M.T., York, A.G., Espinosa, J.M., Taatjes, D.J. (2008) Cooperative activity of cdk8 and GCN5L within Mediator directs tandem phosphoacetylation of histone H3. *EMBO Journal* 27 : 1447-1457.
- Moran, A., Ortega, P., de Juan, C., Fernandez-Marcel, T., Sanchez-Pernaute, A., Torres, A.J., Diaz-Rubio, E., Iniesta, P., Benito, M. (2010) Differential colorectal carcinogenesis : Molecular basis and clinical relevance. *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 2 : 151-158.
- Morris, E.J., Ji, J.Y., Yang, F., Di Stefano, L., Herr, A., Moon, N.S., Kwon, E.J., Haigis, K.M., Naar, A.M., Dyson, N.J. (2008) E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8. *Nature* 455 : 552-556.
- Oldham, S.M., Clark, G.J., Gangarosa, L.M., Coffey, R.J., Jr., Der, C.J. (1996) Activation of the Raf-1/MAP kinase cascade is not sufficient for Ras transformation of RIE-1 epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States* 93 : 6924-6928.
- Peinado, H., Marin, F., Cubillo, E., Stark, H.J., Fusenig, N., Nieto, M.A., Cano, A. (2004) Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *Journal of Cell Science* 117 : 2827-2839.
- Peinado, H., Portillo, F., Cano, A. (2004) Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *The International Journal of Developmental Biology* 48 : 365-375.
- Perreault, N., Beaulieu, J.F. (1998) Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. *Experimental Cell Research* 245 : 34-42.
- Piddini, E., Schmid, J.A., de Martin, R., Dotti, C.G. (2001) The Ras-like GTPase Gem is involved in cell shape remodelling and interacts with the novel kinesin-like protein KIF9. *EMBO Journal* 20 : 4076-4087.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., Clevers, H. (2003) Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes & Development* 17 : 1709-1713.
- Pollock, C.B., Shirasawa, S., Sasazuki, T., Kolch, W., Dhillon, A.S. (2005) Oncogenic K-RAS is required to maintain changes in cytoskeletal organization, adhesion, and motility in colon cancer cells. *Cancer Research* 65 : 1244-1250.
- Porter, D.C., Farmaki, E., Altilia, S., Schools, G.P., West, D.K., Chen, M., Chang, B.D., Puzyrev, A.T., Lim, C.U., Rokow-Kittell, R., Friedhoff, L.T., Papavassiliou, A.G., Kalurupalle, S., Hurteau, G., Shi, J., Baran, P.S., Gyorffy, B., Wentland, M.P., Broude, E.V., Kiaris, H., Roninson, I.B. (2012) Cyclin-dependent kinase 8 mediates chemotherapy-induced tumor-promoting paracrine activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States* 109 : 13799-13804.

- Rickert, P., Corden, J.L., Lees, E. (1999) Cyclin C/CDK8 and cyclin H/CDK7/p36 are biochemically distinct CTD kinases. *Oncogene* 18 : 1093-1102.
- Santarpia, L., Lippman, S.M., El-Naggar, A.K. (2012) Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 16 : 103-119.
- Seizl, M., Lariviere, L., Pfaffeneder, T., Wenzek, L., Cramer, P. (2011) Mediator head subcomplex Med11/22 contains a common helix bundle building block with a specific function in transcription initiation complex stabilization. *Nucleic Acids Research* 39: 6291-6304.
- Semenza, G.L. (2012) Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 148 : 399-408.
- Seo, J.O., Han, S.I., Lim, S.C. (2010) Role of CDK8 and beta-catenin in colorectal adenocarcinoma. *Oncology Reports* 24 : 285-291.
- Singh, A., Sweeney, M.F., Yu, M., Burger, A., Greninger, P., Benes, C., Haber, D.A., Settleman, J. (2012) TAK1 inhibition promotes apoptosis in KRAS-dependent colon cancers. *Cell* 148 : 639-650.
- Tassan, J.P., Jaquenoud, M., Leopold, P., Schultz, S.J., Nigg, E.A. (1995) Identification of human cyclin-dependent kinase 8, a putative protein kinase partner for cyclin C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States* 92 : 8871-8875.
- Thiery, J.P. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer* 2 : 442-454.
- Totsukawa, G., Wu, Y., Sasaki, Y., Hartshorne, D.J., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Matsumura, F. (2004) Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *The Journal of Cell Biology* 164: 427-429.
- Voisin, L., Julien, C., Duhamel, S., Gopalbhai, K., Claveau, I., Saba-El-Leil, M.K., Rodrigue-Gervais, I.G., Gaboury, L., Lamarre, D., Basik, M., Meloche, S. (2008) Activation of MEK1 or MEK2 isoform is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells and induce the formation of metastatic tumors. *BMC Cancer* 8 : 337-2407-8-337.
- Wagner, E.F., Nebreda, A.R. (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer* 9 : 537-549.
- Ward, Y., Kelly, K. (2006) Gem protein signaling and regulation. *Method in Enzymology* 407 : 468-483.
- Ward, Y., Spinelli, B., Quon, M.J., Chen, H., Ikeda, S.R., Kelly, K. (2004) Phosphorylation of critical serine residues in Gem separates cytoskeletal reorganization from down-regulation of calcium channel activity. *Molecular and Cellular Biology* 24 : 651-661.
- Ward, Y., Yap, S.F., Ravichandran, V., Matsumura, F., Ito, M., Spinelli, B., Kelly, K. (2002) The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho-Rho kinase pathway. *The Journal of Cell Biology* 157 : 291-302.

- Wellbrock, C., Karasarides, M., Marais, R. (2004) The RAF proteins take centre stage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 : 875-885.
- Westerling, T., Kuuluvainen, E., Makela, T.P. (2007) Cdk8 is essential for preimplantation mouse development. *Molecular and Cellular Biology* 27 : 6177-6182.
- Worthley, D.L., Leggett, B.A. (2010) Colorectal cancer : molecular features and clinical opportunities. *Clinical Biochemist Reviews* 31 : 31-38.
- Xu, W., Ji, J.Y. (2011) Dysregulation of CDK8 and Cyclin C in tumorigenesis. *Journal of Genetics & Genomics* 38 : 439-452.
- Yamada, K.M., Araki, M. (2001) Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *Journal of Cell Science* 114 : 2375-2382.
- Yang, J., Weinberg, R.A. (2008) Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental Cell* 14 : 818-829.
- Yarden, Y., Sliwkowski, M.X. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 : 127-137.

ANNEXE



Impact de l'inhibition d'expression de CDK8 sur l'expression de *gem*.

Les cellules IEC-6 BRAF^{V600E}ER, déficientes ou non pour l'expression de CDK8, ont été stimulées au tamoxifène (50 nM) pendant 48 h. Par la suite, les cellules ont été lysées et l'ARN a été isolé pour l'analyse par PCR-quantitative des transcrits de *gem* et de *cdk8*. Ces résultats sont préliminaires et représentent une expérience (n=1). NS : non stimulé.